

# **Efeito de uma Protease em dietas de Milho e Bagaço de Soja nos Índices Produtivos dos Frangos de Carne**

**Diogo Blasco Amorim Pereira Lopes**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Zootécnica – Produção Animal**

Orientadora: Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

## **Júri:**

Presidente: Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Carlos Mendes Godinho Andrade Fontes, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo Redford, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

2018

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Madalena Lordelo, pela oportunidade concedida, pelos seus conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade prestada.

Aos meus amigos, por sempre terem estado a meu lado durante o meu percurso universitário. Obrigado por terem partilhado comigo os melhores anos da minha vida, por toda a vossa amizade, companheirismo e apoio.

À minha madrinha, por todo o seu amor, disponibilidade e apoio. Muito obrigado por me ter recebido de braços abertos durante todo o meu percurso académico.

Aos meus avós maternos, por todo o amor, carinho e apoio que me deram durante toda a minha vida. O que sou hoje, é muito graças a vocês. Muito obrigado.

Aos meus irmãos mais novos, por todos os momentos partilhados em toda a minha vida. Muito obrigado por sempre me terem dado boa disposição e alegria.

À minha irmã, por todo o seu apoio psicológico e incentivo, principalmente durante a realização deste projeto, onde fez-me ver as coisas por outro prisma. Muito obrigado por me ter proporcionado uma breve estadia pelo estrangeiro, onde me fez abrir novos horizontes.

Aos meus pais, por todo o amor, carinho, apoio e esforço que fizeram para eu chegar até aqui, sem eles não teria sido possível. O meu muito obrigado! Um especial agradecimento à minha mãe pelo seu amor incondicional e disponibilidade em toda a minha vida. Bem-hajas!

## **Resumo**

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito da suplementação da protease em regimes alimentares à base de milho e bagaço de soja, nos índices produtivos dos frangos de carne, no período dos 0 aos 35 dias de idade. Para isso, 200 pintos do dia, machos, da estirpe ROSS 308, foram divididos por quatro tratamentos, cada um com 10 réplicas. Os tratamentos eram constituídos por uma dieta controle com elevado nível proteico (DC), um tratamento onde as necessidades proteicas e de aminoácidos foram reduzidas em 5% (95PB), um tratamento suplementado com protease onde as necessidades proteicas e de aminoácidos foram reduzidas em 5% (95PB+EP) e um tratamento suplementado, onde o teor proteico e de aminoácidos foram reduzidos correspondente à contribuição da protease (DC-EP)+EP. O peso vivo e a ingestão de alimento foram registados semanalmente e na mudança de fase (dia 12 e 25). No final do ensaio, foram determinadas as dimensões dos órgãos do sistema digestivo e a viscosidade dos conteúdos digestivos. Nas primeiras três semanas não houve diferenças significativas entre tratamentos para o peso vivo e o ganho de peso. A partir da terceira semana até ao final do ensaio, com a suplementação de protease melhorou-se o peso vivo e o ganho de peso dos frangos de carne sujeitos a dietas de baixa densidade proteica e de aminoácidos, compensando a falta de nutrientes.

Os resultados indicam que esta enzima pode ter um efeito positivo nos índices produtivos dos frangos de carne alimentados com rações à base de milho e bagaço de soja, principalmente em regimes de baixo teor proteico e baixo teor de aminoácidos.

**Palavras-Chave:** Frangos de carne; milho; bagaço de soja; protease; proteína.

## **Abstract**

The aim of the present study was to determine the effect of protease supplementation on maize and soybean meal diets in the productive parameters of broilers from 0 to 35 days of age. For this, 200 male chicks of the ROSS 308 breed were divided by four treatments, each with 10 replicates. Treatments consisted of a basal control diet (DC), a reduced protein diet that provided only 95% of crude protein and amino acids of the control diet (95PB), a reduced protein diet to which 130g/T of protease was added (95PB+EP) and a reduced protein diet corresponding to the protease contribution in crude protein and amino acids to which 130g/T of protease was added (DC-EP)+EP. The body weight and feed intake were measured weekly plus at growth phase change (day 12 and 25). At the end of the assay, the dimensions of the digestive system's organs and the viscosity of the digestive contents were determined. In the first three weeks of the assay there weren't significant differences between treatments for body weight and weight gain. From the third week until the end of the assay, protease supplementation improved broiler's body weight and weight gain subjected to low protein and amino acid diets, to make up the lack of nutrients.

The results indicate that this enzyme may have a positive effect on the broiler's productive parameters fed with maize and soybean meal diets, especially in low protein and low amino acid levels.

**Keywords:** Broilers; maize; soybean meal; protease; protein.

## Índice

Agradecimentos .....	II
Resumo .....	III
Abstract .....	IV
Índice .....	V
Lista de Figuras .....	VII
Lista de Quadros .....	VIII
Lista de Abreviaturas .....	IX
Capítulo I- Introdução .....	1
Capítulo II- Revisão Bibliográfica .....	2
1. Frangos de Carne .....	2
Sistema digestivo .....	2
Desenvolvimento do sistema digestivo .....	5
2. Alimentação .....	7
Milho .....	8
Bagaço de soja .....	9
3. Fatores antinutricionais .....	11
Fatores antinutricionais nos cereais .....	11
Fatores antinutricionais no bagaço de soja .....	14
4. Enzimas .....	15
Definição .....	15
Uso de enzimas .....	16
Enzimas exógenas em avicultura .....	17
5. Estado de Arte .....	21
6. Objetivos .....	22
Capítulo III- Materiais e Métodos .....	23
1. Instalação das aves .....	23
2. Alimento composto concentrado .....	23
3. Maneio dos pintos .....	25
4. Procedimentos analíticos .....	26
5. Análise Estatística .....	28
Capítulo IV- Resultados .....	29
1. Composição dos regimes alimentares .....	29
2. Peso vivo .....	29
3. Ganho médio diário de peso .....	31
4. Alimento ingerido .....	32

5. Índice de conversão .....	32
6. Mortalidade .....	33
7. Viscosidade dos conteúdos digestivos .....	34
8. Dimensões dos órgãos do sistema digestivo .....	34
Capítulo V- Discussão .....	36
Capítulo VI- Conclusão .....	41
Capítulo VII- Referências Bibliográficas .....	42

## Lista de Figuras

Figura 1- Representação do sistema digestivo do frango ( <a href="http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/sistema-digestorio-das-aves.htm">http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/sistema-digestorio-das-aves.htm</a> ) .....	5
Figura 2- Estrutura molecular da celulose ( <a href="https://www.infoescola.com/bioquimica/polissacarideos/">https://www.infoescola.com/bioquimica/polissacarideos/</a> ) .....	12
Figura 3 - Estrutura molecular do arabinoxilano ( <a href="https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-arabinoxylan_fig7_257561875">https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-arabinoxylan_fig7_257561875</a> ) .....	13
Figura 4- Disposição dos quatro tratamentos na sala .....	24

## Lista de Quadros

Quadro 1- Composição química <sup>1</sup> do milho em (%) e o seu valor energético (kcal/kg) (Adaptado de Blas et al., 2016) .....	8
Quadro 2- Composição em aminoácidos no milho e na proteína bruta <sup>1</sup> (Adaptado de Blas et al., 2016) .....	9
Quadro 3- Composição química <sup>1</sup> do bagaço de soja em (% alimento) e o seu valor energético (kcal/kg) (Adaptado de Blas et al., 2016) .....	10
Quadro 4- Composição dos aminoácidos presentes no bagaço de soja e na proteína bruta <sup>1</sup> do mesmo bagaço e a percentagem da digestibilidade dos aminoácidos <sup>1</sup> (Adaptado de Blas et al., 2016) .....	11
Quadro 5- Tipos de enzimas alimentares, substrato e matéria-prima (Adaptado de Ravindran, 2010) .....	18
Quadro 6- Tratamentos Experimentais .....	24
Quadro 7- Composição centesimal <sup>1</sup> e nutricional <sup>1</sup> dos diferentes tratamentos experimentais <sup>2</sup> .....	25
Quadro 8- Análises efetuadas para os diferentes tratamentos <sup>1</sup> experimentais nas fases de iniciação, crescimento e de acabamento .....	29
Quadro 9- Peso vivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (g/ave) ...	30
Quadro 10- Peso vivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (g/ave), durante o período de iniciação (0-12 dias), de crescimento (12-25 dias) e de acabamento (25-35 dias) .....	30
Quadro 11- Ganhos médio diário de peso total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (g/ave) .....	31
Quadro 12- Ingestão individual total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (g/ave) .....	32
Quadro 13- Índice de conversão total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos .....	33
Quadro 14- Número de frangos mortos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> para os períodos de iniciação, crescimento e de acabamento .....	33
Quadro 15- Viscosidade do conteúdo digestivo dos frangos sujeitos aos diferentes tratamentos <sup>1</sup> (cpo) .....	34
Quadro 16- Peso relativo dos órgãos do sistema digestivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (g/kg PV) .....	35
Quadro 17- Comprimento relativo dos órgãos do sistema digestivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos <sup>1</sup> (cm/kg PV) .....	35



## **Lista de Abreviaturas**

PNA - Polissacáridos não amiláceos

FAN - Fatores antinutricionais

pH - Potencial hidroniônico

PB - Proteína Bruta

MS - Matéria Seca

EMA - Energia Metabolizável Aparente

IC - Índice de Conversão

FB - Fibra Bruta

GB - Gordura Bruta

ENA - Extratos não Azotados

PV - Peso Vivo

(DC-EP)+EP - Tratamento suplementado com protease com teor proteico e de aminoácidos reduzidos correspondente à contribuição da protease

95PB - Tratamento com teor proteico e de aminoácidos reduzidos em 5%

95PB+EP - Tratamento suplementado com protease com teor proteico e de aminoácidos reduzidos em 5%

DC - Dieta Controlo

GMD - Ganho Médio Diário

## Capítulo I- Introdução

Atualmente, a carne de frango é uma das mais consumidas por todo o mundo, devido às suas boas características nutricionais e ao seu preço reduzido comparativamente a outras carnes. O facto de ser uma carne branca com reduzido teor em gordura torna-a uma das primeiras escolhas dos consumidores, que cada vez mais se preocupam com a sua saúde. Os avanços atingidos na área da nutrição, sanidade, manejo e da genética têm permitido melhorar o animal, bem como produzir regimes alimentares de elevada qualidade a um preço menor. Assim, possibilita a produção de um produto de uma forma mais rápida e eficiente, a preços altamente competitivos.

O milho e o bagaço de soja são os ingredientes mais utilizados nas dietas das aves. O milho possui um elevado valor energético e um baixo teor em polissacáridos não amiláceos (PNA) quando comparado com outros cereais, justificando o seu uso na alimentação dos frangos de carne. O bagaço de soja é utilizado devido ao seu elevado valor proteico e baixo grau de lenhificação em relação a outras proteínas vegetais. O bagaço de soja também contém fatores antinutricionais (FAN), que são os inibidores de protease e tripsina, embora parte seja destruído durante o processamento do bagaço.

Com a suplementação da protease é possível aumentar a concentração de enzimas capazes de digerir proteína, melhorando a digestibilidade proteica e a utilização de azoto por parte do animal, e consequentemente, uma melhoria no crescimento do frango de carne.

O efeito da acção da protease conjunta com outros suplementos enzimáticos tem sido exaustivamente estudado ao longo dos anos. Contudo, o efeito da utilização da protease, como único suplemento enzimático em dietas de milho e bagaço de soja na produção de frangos de carne tem sido menos estudado.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da incorporação da protease nos índices produtivos dos frangos de carne, quando alimentados à base de milho e bagaço de soja.

## Capítulo II- Revisão Bibliográfica

### 1. Frangos de carne

#### Sistema digestivo

Os frangos de carne são animais de crescimento rápido, com elevados requisitos em proteína e energia. Para poderem satisfazer as suas necessidades é imprescindível um sistema digestivo desenvolvido, capaz de ingerir o alimento, digeri-lo e absorver eficazmente os nutrientes finais. A digestão dos alimentos consiste em diferentes processos físicos e químicos aos quais o alimento ingerido está sujeito. As partículas mais complexas são transformadas em partículas químicas mais simples que podem ser absorvidas na parede intestinal. Neste processo, os nutrientes são transferidos do lúmen intestinal para o fluxo sanguíneo, que são transportados para o fígado, e daí para os diferentes tecidos do organismo, de modo a serem utilizados na atividade metabólica das células (Larbier et al., 1992).

As aves dispõem de um sistema digestivo monogástrico curto e simples. Ao contrário do que se sucede nos ruminantes, o tempo de retenção do conteúdo digestivo é reduzido e a microflora presente é relativamente escassa, traduzindo-se em pouco tempo para a microflora intestinal atuar na digestão. As aves estão, então, dependentes das suas secreções enzimáticas para a digestão do alimento ingerido (Parkhurst et al., 1988).

Os órgãos integrantes do aparelho digestivo da ave incluem: o bico, a cavidade bucal, língua, faringe, o esófago, papo, proventrículo, a moela, o intestino delgado e grosso, os cecos e a cloaca. Os órgãos anexos ao tubo digestivo são compostos pelas glândulas salivares, pâncreas, fígado e a vesícula biliar.

As aves apresentam algumas particularidades, o bico é constituído por dois invólucros córneos que cobrem as mandíbulas, não possuindo lábios nem dentes (Larbier et al., 1992). O bico serve para capturar o alimento e se for necessário quebrá-lo em porções menores, de forma a ser deglutido (Parkhurst et al., 1988; Appleby et al., 1992).

A ausência do palato mole e da epiglote formam uma cavidade única, compreendida desde a boca até à faringe, o que explica como a água atravessa passivamente pela cavidade através de movimentos da cabeça (Larbier et al., 1992).

As glândulas salivares existentes na cavidade bucal são responsáveis pela produção do suco salivar, tem como função assegurar a lubrificação do bolo alimentar, facilitando a sua passagem para o esófago, bem como o humedecimento permanente da cavidade. O suco salivar é rico em bicarbonato de sódio, conferindo-lhe um pH entre os 7-7,5. Também se nota a presença de  $\alpha$ -amilase e inicia-se logo uma digestão do amido na cavidade bucal, em

pequena escala, pois há pouco tempo para a atividade enzimática (Englert, 1982; Leeson et al., 2001).

A língua tem uma forma pontiaguda, rugosa e altamente queratinizada, forçando o alimento humedecido a descer para o esôfago, até chegar ao papo (Bell et al., 2002).

O papo encontra-se a meio do esôfago e pode ser considerado como uma dilatação do mesmo, onde o bolo alimentar pode ser armazenado provisoriamente e é suavizado e humedecido. O tempo de retenção do bolo alimentar no papo depende da sua capacidade de expansão, o tamanho das partículas ingeridas e o seu grau de humidificação e da quantidade de alimento na moela. Deste modo, o papo funciona como um regulador do trânsito digestivo, especialmente se a ave for submetida a um racionamento severo (Parkhurst et al., 1988; Larbier et al., 1992). No papo nota-se uma descida do pH para 4,5 e alguma digestão do amido por parte da  $\alpha$ -amilase presente na saliva, se o tempo de permanência do alimento for suficiente (Leeson et al., 2001).

Ao sair do papo, o quimo entra numa pequena cavidade, denominada proventrículo ou estômago verdadeiro, que é revestido por um epitélio glandular (Englert, 1982). Este epitélio segrega uma proenzima proteolítica, pepsinogénio e ácido clorídrico. O ácido clorídrico é responsável pela descida de pH do meio até 2,5, quebrando os tegumentos das sementes. A pepsina, convertida a partir do pepsinogénio e a um pH baixo, atua na digestão das proteínas, tornando-os em polipéptidos. Ainda assim, é pequena a digestão que acontece no proventrículo, devido ao seu reduzido tamanho, passando para a moela (Parkhurst et al., 1988; Leeson et al., 2001).

A moela, também conhecida por estômago muscular, consiste em dois músculos espessos e poderosos capazes de exercer muita força, através de contrações e expansões transformam qualquer partícula do alimento numa pasta semi-líquida, pronta a entrar no intestino (Englert, 1982; Parkhurst et al., 1988). Segundo Parkhurst et al. (1988), a moela é revestida por uma camada epitelial grossa, capaz de resistir ao suco gástrico ácido proveniente do proventrículo. Bell et al. (2002) também concluiu que quanto menor o tamanho das partículas, menor o tempo de retenção na moela. Larbier et al. (1992) constata a existência de uma constrição pilórica na moela que atua como um filtro que permite que somente as pequenas partículas do quimo passem.

O intestino delgado divide-se entre duodeno, jejuno e íleo, e termina no início do intestino grosso com a inserção dos cecos. O duodeno apresenta-se em forma de alça com o pâncreas no interior (Englert, 1982). É na alça ascendente do duodeno, onde os ductos biliares e pancreáticos convergem com o trato digestivo. Terminada a alça duodenal, inicia-se o jejuno.

É no jejuno onde ocorre a grande parte da absorção dos nutrientes, devido à sua área superficial elevada criada pelas vilosidades. Exteriormente, a mucosa intestinal é formada por uma camada muscular responsável pelos movimentos peristálticos e segmentares do intestino, uma intermédia que contém os vasos sanguíneos e nervos e a camada interna, onde estão presentes os enterócitos dispostos nas vilosidades, onde os nutrientes são absorvidos. O suco intestinal segregado ao longo do intestino delgado, contém eletrólitos e enzimas, e esta última é especializada na hidrólise de oligossacarídeos (Parkhurst et al., 1988; Larbier et al., 1992).

De seguida, apresenta-se o íleo. O fim do jejuno e início do íleo, é assinalado pelo Divertículo de Meckel. O íleo estende-se até ao esfíncter ileocecal, que controla o fluxo entre o íleo, cólon e os cecos (Appleby et al., 1992).

O fígado é o órgão que segrega a bÍlis, esta secreção flui para o duodeno por dois canais, no lobo esquerdo flui diretamente e no direito flui indiretamente, sendo armazenado, primeiramente na vesícula biliar. A entrada do quimo no duodeno causa contrações na vesícula, libertando a bÍlis para o intestino (Parkhurst et al., 1988). Devido ao pH ligeiramente ácido da bÍlis (pH 6) neutraliza a acidez do quimo. A bÍlis não contém enzimas digestivas, mas os seus sais biliares emulsionam os lípidos, facilitando a ação da lipase pancreática (Larbier et al., 1992; Bell et al. 2002).

O pâncreas está inserido no meio da alça duodenal e o suco pancreático ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina) tem um forte poder hidrolítico direcionado aos prótidos, glúcidos e lípidos. O seu alto teor em bicarbonato, torna este suco alcalino (pH=8), diluindo a acidez do quimo, garantindo a ação das enzimas intestinais no geral. As enzimas pancreáticas são segregadas como proenzimas e activadas no lúmen intestinal (Larbier et al., 1992; Bell et al. 2002).

Os cecos que se assemelham a bolsas estão localizados na inserção no intestino delgado e no intestino grosso (Parkhurst et al., 1988). Svihus et al. (2013) concluiu que apenas partículas pequenas/solúveis incorporados em urina ou fluídos digestivos, voltam aos cecos. Assim sendo, água e eletrólitos são reabsorvidos, bem como, uma ligeira fermentação microbiana irá reutilizar azoto renal derivado do ácido úrico.

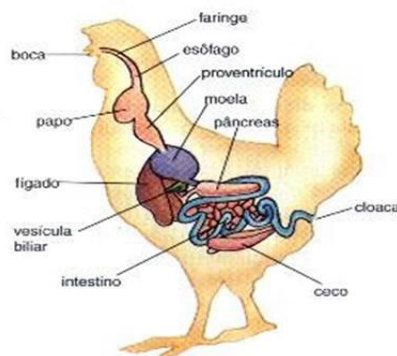
De seguida, o intestino grosso, estende-se desde o intestino delgado até à cloaca. É consensual, que a função do intestino grosso é a reabsorção de água, mantendo a regulação osmótica da ave (Appleby et al., 1992; Bell et al. 2002). Larbier et al. (1992) acrescenta que a digestão dos alimentos neste órgão é muito baixa, devido ao facto do intestino grosso ser curto, havendo apenas uma ligeira atividade bacteriana que não hidrolisa nem celulose, nem outros PNA.

A cloaca pode ser dividida em três partes: *coprodeum*, *urodeum* e *proctodeum*. O *coprodeum*, é onde ocorre a acumulação de fezes. *Urodeum*, é o local onde se ligam o sistema urinário e reprodutor ao trato digestivo. A urina pode ainda subir aos cecos, onde a água e

eletrólitos são reabsorvidos, e a ureia acumulada é expulsa com a matéria fecal. O *proctodeum*, comunica com a Bursa de Fabricius (órgão linfóide) e abre no exterior por meio de um esfíncter (Larbier et al., 1992). Na Figura 1 está representado o sistema digestivo do frango.

Figura 1- Representação do sistema digestivo do frango

(Fonte: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/sistema-digestorio-das-aves.htm>)



### Desenvolvimento do sistema digestivo

Muitos são os estudos que analisam o crescimento inicial do tubo digestivo. Muitos destes estudos centram-se nas mudanças morfológicas do intestino delgado e na secreção e atividade enzimática (Noy et al., 1997; Uni et al., 1998; Uni et al., 2003), outros na mudança da dependência metabólica e absorção de nutrientes pós-eclosão (Noy et al., 2001; Sklan, 2003) e alguns focam-se apenas no período de incubação (Uni et al., 2003).

O desenvolvimento do tubo digestivo do frango é muito precoce, uma vez que o intestino do embrião começa a formar-se a partir do segundo dia de incubação (Larbier et al., 1992). Uni et al. (2003), referiu que nos três últimos dias da fase de incubação, o peso relativo do intestino aumenta de 1% para 3,5%.

Durante o desenvolvimento embrionário, a transferência de nutrientes é feita diretamente do saco vitelino para a circulação por endocitose (Noy et al., 2002). Ao 19º dia, o saco vitelino é incorporado na cavidade abdominal, continuando a fornecer energia até uns dias depois da eclosão (Uni et al., 1998). Depois da incorporação do saco, devido a movimentos antiperistálticos, os conteúdos são transferidos para a região proximal do intestino delgado, onde são digeridos pela lipase pancreática e absorvidos (Noy et al., 2002; Sklan 2003).

O pinto tem de fazer a transição da dependência metabólica rica em lípidos

provenientes do saco vitelino para a dieta exógena rica em prótidos e glúcidos, esta transição é um pré-requisito para um crescimento rápido e envolve mudanças dramáticas no sistema digestivo, incluindo a secreção de enzimas digestivas e iniciação da absorção de aminoácidos e hexoses (Uni et al., 1995). Assim Noy et al. (2001) verificou um aumento da absorção da glucose de 50% para 80%; da metionina desde 43% para 75%, nos primeiros quatro dias de idade, já o ácido oleico tinha uma absorção de 80% e assim permaneceu.

Maiorka et al. (2006) afirma que após a eclosão, o sistema digestivo está anatomicamente completo, mas está funcionalmente imaturo. As mudanças mais evidentes são o aumento do comprimento intestinal, altura e densidade dos enterócitos.

Noy et al. (1997) e Maiorka et al. (2000) relatam um rápido aumento de peso relativo do proventrículo, moela e intestino delgado em relação ao peso vivo (PV) do animal nos dias após a eclosão. Embora a taxas de crescimento diferentes para os segmentos do intestino delgado, é atingido o pico de crescimento entre o 3º e o 8º dia pós-eclosão. O tamanho relativo do intestino delgado começa a diminuir com a idade (Noy et al., 1999; Sklan et al., 2000).

Noy et al. (1997) observou após a eclosão, que o maior grau de crescimento do volume das vilosidades ocorre no duodeno até ao 4º dia, com posterior decréscimo. Ao passo que, no jejuno e no íleo, o grau de crescimento mantém-se até ao 10º dia, diminuindo posteriormente. A profundidade da cripta aumenta linearmente no duodeno e jejuno até ao 10º e 12º dia, com maior crescimento no jejuno. Neste período, a densidade dos enterócitos mantém-se no duodeno e no íleo e aumenta ligeiramente no jejuno (Noy et al.1997).

Quanto às secreções pancreáticas, foram detetadas amilase e tripsina ao 18º dia da incubação e a lipase foi também detetada antes da eclosão. A concentração de amilase, tripsina e lipases no pâncreas e a sua secreção para o duodeno aumenta após a eclosão, apesar da taxa de aumento ser diferente para cada enzima (Noy et al., 1997). Segundo Sklan et al. (2000), a ingestão de alimento desencadeia uma maior secreção de tripsina e de amilase, que são segregadas em quantidades constantes com a ingestão, à medida que a ave cresce. Entre o 4º e o 21º dia de idade, a secreção diária de amilase, em função do alimento ingerido, é maior e a de lipase é menor. O pico de secreção de tripsina, amilase e lipase é verificado ao 4º, ao 7º e ao 10º dia de idade, respetivamente (Noy et al., 1997).

A secreção da biliar é baixa após a eclosão, não sendo suficiente até ao 4º dia de idade, entre o 4º e o 10º dia, a secreção duplica, tornando-se razoável em relação ao alimento ingerido, aumentando até ao 21º dia e depois decrescendo (Noy et al.1997).

## **2. Alimentação**

O conhecimento das necessidades nutricionais dos frangos é muito importante para assegurar uma ótima alimentação e, por conseguinte, alcança uma ótima performance da ave.

Segundo Leeson et al. (2001), as necessidades nutricionais variam em função da genética da ave, valor energético da dieta, meio ambiente e tipos de produção e manejo, também consideram como fatores, idade, estados de saúde e stress. Na formulação das dietas, o alcance dos requisitos nutricionais das aves pode ser difícil, devido às inter-relações dos nutrientes, à disponibilidade nutricional nos ingredientes, variabilidade dos níveis de nutrientes dos alimentos, presença de toxinas nos alimentos, influência bacteriana intestinal e ao pH intestinal.

A dieta dos frangos deve fornecer uma fonte de energia equilibrada, proteína e aminoácidos, vitaminas, minerais e ácidos gordos essenciais, para que os frangos obtenham uma boa performance e um ótimo crescimento. Assim, para a formulação das dietas é deveras importante ter em consideração, as necessidades nutricionais da ave e a concentração desses nutrientes nos ingredientes. Para além destes dois critérios, deve-se ter em conta as fases de crescimento das aves.

A ingestão do alimento composto pelo frango depende da idade do frango, bem como da apresentação. Segundo Aviagen (2014), na fase de iniciação (primeiros 10 a 14 dias), a dieta deve-se basear na performance biológica do frango, pois a absorção de nutrientes atinge valores elevados, mas a ingestão de alimento é mínima. Na transição para a fase de crescimento, há uma mudança na apresentação do alimento, de migalhas para granulado, também mudando a densidade nutricional. Esta transição de fase deve ser monitorizada, de modo a prevenir uma redução de ingestão de alimento. Já na fase de acabamento (depois do 25º dia de idade), deve-se ter em consideração os custos da alimentação e a otimização do retorno financeiro, pois ocorre a maior ingestão de alimento, resultando num maior custo para a produção.

As matérias-primas utilizadas nas dietas das aves são variadas, dependendo da região do mundo. De acordo com Leeson et al. (2001), o milho e a soja são os ingredientes mais utilizados, pois são boas fontes de energia e proteína, respetivamente. A incorporação destas matérias-primas é elevada, chegando a atingir níveis de 70 a 80% da formulação da dieta. De modo que, o milho e a soja são considerados a base ideal de uma dieta para frangos. Relativamente aos restantes ingredientes utilizados, a sua presença na dieta varia da disponibilidade geográfica e do preço no mercado.



## Milho

Entre os cereais, o grão de milho é muito apreciado pelo seu elevado valor energético. Também é apreciado pela reduzida presença de fatores antinutritivos, variabilidade da composição química e elevada palatibilidade (Labier et al., 1992; Leeson et al., 2001). Segundo Bedford (1995), o grão de milho, em média, contém 83% de endosperma, 11% de gérmen e 6% de pericarpo, sendo que metade do endosperma é do tipo vítreo e apresenta uma maior densidade e teor proteico que o tipo farináceo.

O milho deve o seu elevado valor energético ao alto teor de amido e gordura e baixo teor em fibra (Quadro 1). Segundo de Blas et al. (2010), a proporção média de amilose:amilopectina é de 1:3, sendo que pode ser bastante variável. A fração fibrosa, concentrada no endosperma, inclui principalmente celulose e pentosanas, tendo um grau de lenhificação muito baixo, traduzindo-se numa digestibilidade da fibra maior em relação aos restantes cereais, especialmente nos monogástricos. O teor de gordura do milho é apreciável, tendo uma boa fonte de ácido linoleico (1,66%), sendo uma boa escolha para a produção avícola.

Quadro 1- Composição química<sup>1</sup> do milho em (%) e o seu valor energético (kcal/kg) (Adaptado de Blas et al., 2016).

	H	Cinza	PB	GB	FB	NDF	ADF	ADL	Amido	Açúcares	EMA
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	kcal/kg
<b>Milho</b>	13,6	1,1	7,3	3,3	2,1	9	2,8	0,7	63,8	1,7	3285

<sup>1</sup>H- Humidade; PB- Proteína Bruta; GB- Gordura Bruta; FB- Fibra Bruta; NDF- Fibra detergente neutro; ADF-Fibra detergente ácido; ADL- Leninha detergente ácido; EMA- Energia Metabolizável Aparente

Segundo Lázaro et al. (2008), os frangos não têm necessidades de proteína bruta (PB), mas sim de aminoácidos, sendo que a utilidade da proteína na dieta depende do fornecimento da precisa quantidade de aminoácidos essenciais. O milho tem um baixo teor proteico e a sua qualidade também é baixa, apresentando pouca disponibilidade de aminoácidos, destaque para a lisina e triptofano (Quadro 2). Mesmo assim, os frangos são os que têm maior coeficiente de digestibilidade proteica, cerca de 85% (de Blas et al., 2016).

Quadro 2- Composição em aminoácidos no milho e na proteína bruta<sup>1</sup> (Adaptado de Blas et al., 2016).

Aminoácidos	Composição	
	(%)	PB(%)
<b>Lisina</b>	0,22	2,95
<b>Metionina</b>	0,15	2,07
<b>Metionina+Cisteína</b>	0,31	4,29
<b>Triptofano</b>	0,06	0,78
<b>Valina</b>	0,36	4,75
<b>Treonina</b>	0,27	3,56
<b>Isoleucina</b>	0,26	3,40
<b>Arginina</b>	0,33	4,50

<sup>1</sup>PB- Proteína Bruta

Os minerais mais importantes na produção avícola são o cálcio e o fósforo que têm um papel vital no desenvolvimento das aves, por isso devem ser suplementados o quanto antes, logo após a eclosão. O cálcio, por ser fundamental na formação do esqueleto e o fósforo, igualmente para formação do esqueleto e funcionamento celular no organismo (Lázaro et al., 2008). Segundo Larbier et al. (1992), os grãos de cereais são deficitários ao nível mineral (cálcio e fósforo), a carência deles tem um efeito acentuado nas aves em crescimento. A carência em cálcio desmineraliza o esqueleto, especialmente nos ossos de elevada taxa de crescimento e a carência em fósforo associa-se à falta de apetite, redução da taxa de crescimento, problemas de locomoção e consequentemente, morte.

O grão de milho tem um baixo teor em vitaminas hidrossolúveis (vitaminas do complexo B e vitamina C), mas uma boa fonte em vitamina A (de Blas et al., 2016) e em xantófilas, responsável pela coloração da pele dos frangos e da gema do ovo (Larbier et al., 1992).

### **Bagaço de soja**

Para além da energia, os suplementos proteicos constituem o maior componente de uma dieta, por isso, é extremamente importante ter em consideração, o teor proteico da dieta. A soja pode ser administrada inteira ou como bagaço de soja, subproduto da extração de óleo. Na sua maioria, a extração é executada recorrendo a um solvente (de Blas et al., 2010).

O bagaço de soja é o ingrediente proteico mais usado nas dietas dos frangos de carne, e é considerado como o ingrediente-padrão para fontes proteicas (de Blas et al., 2010). Em

relação a outras fontes vegetais, o bagaço de soja é uma fonte concentrada de proteína e energia, baixa em fibra bruta (Beski et al., 2015). A soja é também, uma fonte rica em hidratos de carbono (32 a 34%), sendo que metade não é estrutural, representando açúcares solúveis (6-8%), mananos (1-2%) oligosacáridos e amido, ainda que inferior a 1% (de Blas et al., 2010). A outra porção representa os polisacáridos estruturais, predominantemente a pectina (12%) (Knudsen, 1997; de Blas et al., 2010). A disponibilidade dos nutrientes no bagaço de soja vai depender do processamento realizado e da presença de fatores antinutricionais (Willis, 2003). O seu teor de 40 a 48% PB, irá depender da quantidade de cascas removidas e do processamento de extração de óleo (Beski et al., 2015).

Quadro 3- Composição química<sup>1</sup> do bagaço de soja em (% alimento) e o seu valor energético (kcal/kg) (Adaptado de Blas et al., 2016).

	H	Cinza	PB	GB	FB	NDF	ADF	ADL	Amido	Açúcares	EMA
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	kcal/kg
<b>Bag. de soja</b>	12,0	6,2	47	1,9	4,1	9,1	5,4	0,3	0,5	7	2360

<sup>1</sup>H- Humidade; PB- Proteína Bruta; GB- Gordura Bruta; FB- Fibra Bruta; NDF- Fibra detergente neutro; ADF-Fibra detergente ácido; ADL- Leninha detergente ácido; EMA- Energia Metabolizável Aparente

O bagaço de soja contém um excelente perfil em aminoácidos (especialmente em lisina) complementares ao milho, a principal fonte de energia na produção avícola. Em comparação com outras oleaginosas, a proteína presente na soja é favorecida devido ao seu excelente perfil de aminoácidos, permitindo equilibrar a maioria das dietas à base de cereais (Ravindran, 2013), e relativamente deficitária em metionina e triptofano (de Blas et al., 2010). Devido à sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais, como a metionina, as proteínas vegetais necessitam, geralmente, de uma fonte suplementar sintética de aminoácidos (Beski et al., 2015). A digestibilidade dos aminoácidos do bagaço de soja nos frangos de carne, em geral, é bastante elevada, com a maior digestibilidade na lisina (91%) (Willis, 2003), aumentando ligeiramente com a remoção da casca. De Blas et al. (2010), ainda afirma que, existe uma correlação positiva entre a quantidade de proteína e a sua digestibilidade, ou seja, quanto maior a percentagem proteica, maior a digestibilidade proteica. Alta digestibilidade, também é obtida em outros aminoácidos, como a metionina, cisteína e treonina (Willis, 2003).

Quadro 4- Composição dos aminoácidos presentes no bagaço de soja e na proteína bruta<sup>1</sup> do mesmo bagaço e a percentagem da digestibilidade dos aminoácidos<sup>1</sup> (Adaptado de Blas et al., 2016).

Aminoácidos	Composição		% Dig. AA
	%	% na PB	
<b>Lisina</b>	2,88	6,13	89
<b>Metionina</b>	0,67	1,43	90
<b>Metionina+Cisteína</b>	1,38	2,94	86
<b>Triptofano</b>	0,63	1,33	86
<b>Valina</b>	2,27	4,84	90
<b>Treonina</b>	1,85	3,94	86
<b>Isoleucina</b>	2,13	4,53	89
<b>Arginina</b>	3,43	7,30	91

<sup>1</sup>PB- Proteína Bruta; Dig. AA- Digestibilidade dos aminoácidos

A nível mineral, o bagaço de soja tem um teor mais rico do que o milho, nomeadamente em cálcio e fósforo. A alta concentração de fósforo (0,64%) irá compensar a baixa concentração presente no milho. Já a concentração de cálcio não é tão elevada (0,29%), mas ainda assim, muito superior à do milho (de Blas et al., 2010). De qualquer modo, para as elevadas necessidades dos frangos é sempre necessário suplementar mineralmente as dietas.

Já a nível vitamínico, o bagaço de soja tem um teor inferior ao do milho, mas com uma concentração elevada em colina (2740 mg/kg), muito superior ao do milho (de Blas et al., 2010). A colina tem funções como construção e manutenção da estrutura celular e essencial no metabolismo do fígado. O interesse neste componente, como suplemento adicional nas dietas é reconhecido por autores (Leeson et al., 2001; Lisboa et al., 2014).

### 3. Fatores antinutricionais

#### Fatores antinutricionais nos cereais

Os fatores antinutricionais dos cereais são os PNA solúvel. Os polissacáridos são polímeros de monossacáridos interligados entre si através de diferentes ligações químicas, sendo classificados em polissacáridos estruturais e não estruturais/reserva. O aparelho digestivo dos animais monogástricos não consegue digerir os hidratos de carbono estruturais pois não possui enzimas digestivas capazes de quebrar as suas ligações  $\beta$ 1-4. É o caso dos PNA que são um dos constituintes das paredes das células vegetais. Os principais

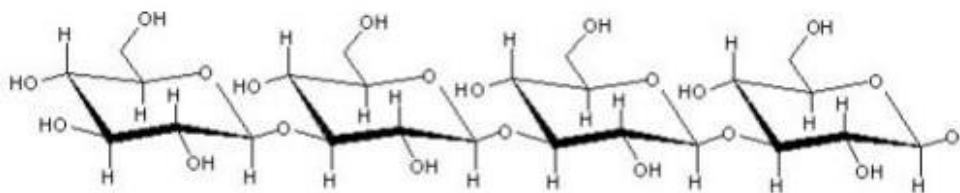
componentes fibrosos dos grãos de cereais, mais propriamente no milho são a celulose e os arabinoxilanos (Choct, 1997).

Segundo Choct (1997), os PNA podem ser classificados de acordo com os monossacáridos presentes na sua constituição, posição e configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) das suas ligações glicosídicas. As hexoses como a D-glucose, D-galactose e D-manose bem como as pentoses como a L-arabinose e D-xilose são os monossacáridos que normalmente estão presentes nas paredes das células vegetais dos cereais. A estrutura e constituição dos diferentes PNA condicionam a sua solubilidade em água e são os solúveis que constituem os principais fatores antinutritivos dos cereais, para os animais monogástricos.

A celulose é o biopolímero mais abundante da Terra e está presente desde 35 a 50 % de matéria seca (MS) na célula da planta. A celulose tem um elevado peso molecular pois é constituído até 15.000 unidades de D-glucose interligadas através de ligações  $\beta$ -(1,4) (Paloheimo et al., 2010). A celulose tem uma estrutura altamente ordenada, constituída por regiões cristalinas e regiões amorfas. As microfibrilhas nas regiões cristalinas estão paralelamente alinhadas, de modo a criar o máximo de ligações de hidrogénio. Já nas regiões amorfas, as microfibrilhas não estão tão organizadas (Choct, 1997; Paloheimo et al., 2010), onde podem ser mais facilmente quebradas em relação às regiões cristalinas.

Figura 2- Estrutura molecular da celulose

(<https://www.infoescola.com/bioquimica/polissacarideos/>)



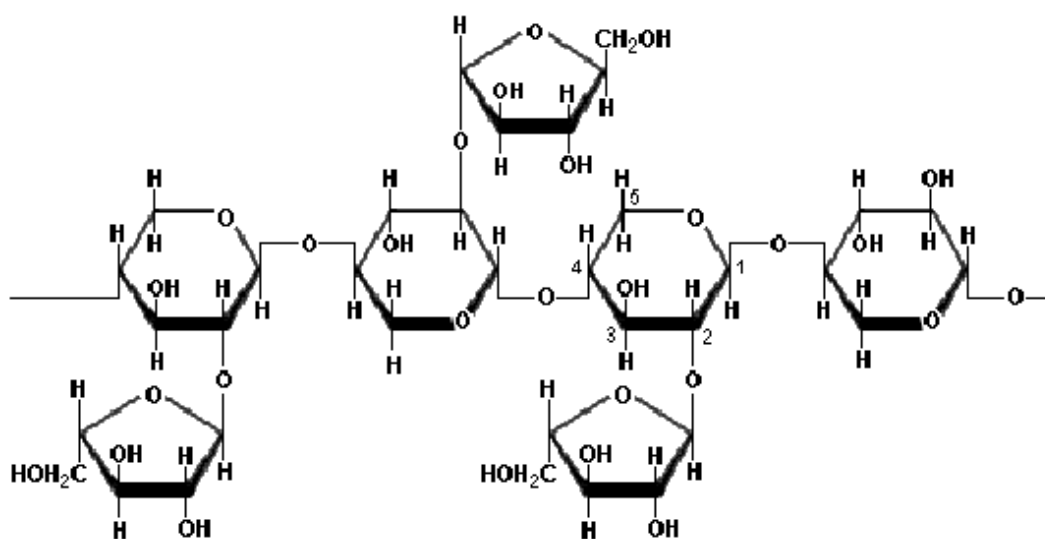
A composição do arabinoxilano é mais complexa uma vez que se trata de um tipo específico de xilano (Choct, 1997). De acordo com Paloheimo et al. (2010), o xilano é o maior componente da hemicelulose e o segundo PNA mais abundante na natureza, representando 30 a 35% da parede celular em cereais. A sua cadeia principal é composta por unidades de xilopiranoses interligadas através de ligações  $\beta$ -(1,4). O seu grau de polimerização depende do tipo de cereal, mas claramente são constituídos por cadeias mais curtas que as da

celulose. Na maioria dos xilanos, ocorrem grupos substitutos ligados às unidades de xilose e, são esses grupos, que determinam a solubilidade, viscosidade e outras propriedades físico-químicas do xilano. A extensão e a natureza dos grupos substitutos variam com a fonte botânica, com o tecido, idade e época de corte da planta. Normalmente, o xilano presente nas paredes celulares das plantas anuais, cereais e pastagens é o arabinoxilano, um importante constituinte da alimentação animal. No arabinoxilano, a pentose D-arabinose está ligada à pentose D-xilose na posição 3, ou eventualmente na posição 2 e sempre na forma de furanose.

As moléculas de arabinoxilano podem ser insolúveis em água se estabelecerem ligação direta com as paredes celulares. Por outro lado, as que não formam essa ligação apresentam solubilidade em água, absorvendo-a dez vezes o seu peso e formando soluções altamente viscosas (Choct, 1997).

Figura 3 - Estrutura molecular do arabinoxilano

([https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-arabinoxylan\\_fig7\\_257561875](https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-arabinoxylan_fig7_257561875))



O milho contém cerca de 0,9% de PNA solúveis e 6 a 8% de PNA insolúveis (Knudsen, 1997; Choct, 2006). Segundo Choct (1997), o principal PNA insolúvel do milho é o arabinoxilano. Por norma, os subprodutos dos cereais contém elevados níveis de componentes da parede celular e são ricos em PNA, com uma baixa qualidade nutritiva. Como o milho contém baixos teores de PNA solúvel, sendo conhecido por cereal não viscoso, não afeta a viscosidade dos conteúdos digestivos dos animais.

Os PNA solúveis, quando presentes em teores elevados nos regimes alimentares, provocam um aumento da viscosidade nos conteúdos digestivos dos animais, diminuindo a sua taxa de passagem, o que leva a uma menor ingestão por parte do animal (Bedford, 2000; Slominski, 2011). Também dificultam a ação das enzimas endógenas na digestão, ao provocarem um efeito de encapsulamento dos nutrientes, reduzindo a sua digestibilidade. Por outro lado, a viscosidade gerada interfere com o transporte dos produtos resultantes da hidrólise através da mucosa intestinal (Slominski, 2011). De acordo com Marquardt et al. (1996), ocorre um aumento na ingestão de água, uma diminuição na ingestão de alimento e do ganho de peso corporal, aumentando o índice de conversão (IC) alimentar. Há também um aumento do tamanho dos órgãos do tubo digestivo, do número de microrganismos anaeróbicos no intestino grosso e uma maior quantidade de água presente nos conteúdos digestivos e excreções (Marquardt et al., 1996).

Choct (1997), apresenta os PNA insolúveis como a maior parte da fibra total nas dietas, mas eles têm pouco ou nenhum efeito sobre a utilização de nutrientes em monogástricos, além da simples diluição de nutrientes com a inclusão até 21% da celulose. Posteriormente, o autor apresenta que os PNA insolúveis têm uma habilidade para atuar como uma barreira física para as enzimas digestivas, como a amilase e a protease, reduzindo a digestão dos nutrientes dentro da parede celular da planta (Choct, 1998). Também Choct (1998) sugere que enzimas com afinidade aos PNA insolúveis obtêm uma resposta positiva na performance dos frangos de carne. Isto, indica a ruptura da matriz da parede celular, especialmente compostos insolúveis, facilitando o acesso das enzimas ao seu substrato durante o curto tempo de retenção do alimento (Choct, 2006).

### **Fatores antinutricionais no bagaço de soja**

As leguminosas, quando adicionadas à dieta como fonte proteica afetam a performance da ave severamente devido aos altos níveis de PNA e à presença de oligosacáridos (5-6%) (Choct, 2006; de Blas et al., 2010), onde a estaquiose é o mais abundante (Knudsen, 1997). O bagaço de soja contém aproximadamente 6% de PNA solúveis, composto essencialmente por ácido urónico, galactose e arabinose, e 18 a 21% de PNA insolúveis, composto essencialmente por xilanos e xiloglucanos (Knudsen, 1997; Choct, 2006). Para além de mais numerosos, em relação ao milho, os PNA das leguminosas são mais complexos estruturalmente, devido à presença de substâncias pépticas (Choct, 2006). Yang et al. (2010) provaram que numa dieta à base de milho e bagaço de soja contém muitos fatores antinutricionais, como  $\beta$ -glucanos,  $\beta$ -manose, inibidores de protease e lectinas. Os inibidores de protease são proteínas vegetais que se ligam e inibem as enzimas digestíveis no sistema digestivo do animal (de Blas et al., 2010). Portanto, as proteínas vegetais têm uma

limitação ao seu uso devido à presença dos fatores antinutricionais. A sua maioria pode ser destruído por processamento térmico. Assim sendo, através da eliminação dos fatores, estes deixam de inativar as enzimas endógenas, aumentando o valor nutricional (Beski et al., 2015).

Ainda, segundo de Blas et al. (2010), a soja contém um número elevado de fatores antinutricionais. Os mais importantes são os inibidores de tripsina que são termossensíveis. Igualmente termossensíveis temos a urease e as lectinas. A soja também contém os fatores alergénicos ou proteínas antigénicas, saponinas e oligosacáridos, estaquiase e rafinose. Os inibidores de tripsina inativam as enzimas pancreáticas, tripsina e quimotripsina, reduzindo a digestibilidade da proteína e causa um crescimento no pâncreas, pois a glândula aumenta a produção de enzimas para compensar a perda. As enzimas perdidas, ricas em aminoácidos sulfurados, reduzem ainda mais o nível de aminoácidos do animal (Willis, 2003). Os fatores alergénicos ou proteínas antigénicas são as proteínas glicina e  $\beta$ -conglucina que atrofiam as vilosidades e provocam uma reação de hipersensibilidade nas microvilosidades do intestino delgado reduzindo a capacidade de absorção dos nutrientes, enquanto que as saponinas afetam o consumo de alimento (de Blas et al., 2010; Lima et al., 2014).

Segundo Willis (2003), o devido tratamento de calor com a humidade certa no processamento da soja destrói os inibidores de tripsina. O bagaço de soja subprocessado afeta negativamente a digestibilidade dos aminoácidos, pois os fatores antinutricionais não estão devidamente destruídos. No caso do bagaço de soja estar superprocessado, também afeta negativamente a digestibilidade dos aminoácidos, pois parte dos aminoácidos foram destruídos ou tornam-se indigestíveis. O autor ainda afirma que, a lisina e a cisteína são particularmente vulneráveis ao processamento excessivo e o teor energético é substancialmente reduzido.

#### **4. Enzimas**

##### **Definição**

Há muito que se conhecem os efeitos positivos da utilização de enzimas exógenas no aproveitamento dos nutrientes e nos índices produtivos das aves. Embora apenas nas últimas décadas, se tenha começado a compreender melhor a composição química dos substratos, tornando possível a síntese de enzimas especializadas para determinado substrato (Ravindran, 2010).

Segundo Fersht (1985), existem mais de 1500 enzimas conhecidas, que diferem nos seus arranjos estruturais e no substrato sob o qual atuam. Na produção avícola as enzimas



exógenas têm sido adicionadas à dieta com o objetivo de reduzir o efeito dos fatores antinutricionais dos substratos, melhorar a digestibilidade dos nutrientes (Leeson et al., 2001; Nunes et al. 2015), resultando numa melhor performance do animal (Nunes et al., 2015).

As enzimas, por definição, são complexas proteínas globulares libertadas pelas células para acelerar reações químicas específicas (Smith, 2009), e a rápida velocidade de reação deve-se à afinidade da enzima com o respetivo substrato (Acosta et al., 2006). As enzimas são caracterizadas pelo aumento da taxa de reações químicas sem as enzimas serem consumidas e sem alterarem o equilíbrio químico (Cooper, 2000).

Cada enzima é um polipéptido com uma sequência única de aminoácidos, embora possa apresentar zonas semelhantes com as de outras enzimas, o que reflete percursos comuns ao longo do processo evolutivo (Cabral et al., 2003). O efeito da enzima nas reações ocorre durante a conversão do substrato para o produto. Para a reação ocorrer, o substrato tem de ser primeiramente convertido num estado energético superior, conhecido como estado de transição. A energia necessária consiste num obstáculo para o progresso da reação, limitando a respetiva taxa. As enzimas atuam através da redução da energia de ativação, aumentando, deste modo, a taxa de reação (Cooper, 2000). Cooper (2000) ainda relatou que, a atividade catalítica das enzimas envolve ligação com os substratos para formar o complexo enzima-substrato. O substrato liga-se a uma região específica da enzima, chamado centro ativo, enquanto isso, o substrato é convertido no produto da reação, que é libertado da enzima.

### **Uso de enzimas**

Há mais de 10.000 anos, as enzimas foram usadas em vários processos na produção de comida muito antes de se conhecer a sua existência e efeito (Khattak et al., 2006). Hoje em dia, as enzimas são consideradas produtos da biotecnologia uma vez que podem ser separadas das células vivas que as sintetizam, no seu estado ativo, para posteriormente catalisarem diversos processos bioquímicos (Scragg, 1988). As enzimas, por serem não tóxicas e biodegradáveis podem ser produzidas em enormes quantidades, a partir de microrganismos sem recorrer a um especial equipamento quimicamente resistente. A sua tecnologia envolve ainda a sua extração, isolamento, purificação e estabilização, de modo a serem utilizadas nas diferentes finalidades de interesse. Cada vez mais são empregues ao nível industrial, nos setores do papel, peles, têxteis, para fabrico de detergentes, mas como uma maior representação na indústria alimentar (Smith, 2009).

De acordo com Marquardt et al. (1996), o uso de enzima, como suplemento na alimentação animal, atraiu o interesse dos produtores de rações e de animais, pois eram visíveis as melhorias na performance animal. Os benefícios do seu uso na produção avícola, para além da melhoria da performance animal e do índice de conversão alimentar através do

aumento do valor nutritivo dos ingredientes incorporados (Bedford, 2000), mas também menores problemas ambientais devido à redução do excreta (Khattak et al., 2006).

As enzimas têm evoluído, experimentalmente, na alimentação das aves desde os anos 80. O seu sucesso inicial foi baixo devido aos complexos enzimáticos utilizados. No início, eram isolados a partir de órgãos animais, pois de facto, facilitava a sua desnaturação. Após isto, começaram a ser sintetizados a partir de microorganismos e aí, começou-se a comercializar muito mais (Acosta et al., 2006). O seu objetivo era o de compensar a ausência de enzimas endógenas dos organismos. Desde então, possibilita um uso mais económico das matérias-primas ao permitir uma maior eficiência no aproveitamento dos seus nutrientes, com consequente diminuição de desperdícios, refletindo-se em benefícios nos índices zootécnicos do animal e na redução do impacto ambiental gerado. De uma forma geral, as enzimas são responsáveis pelo aumento da digestibilidade de nutrientes e ainda pela destruição de fatores antinutricionais que possam interferir com a digestão, absorção e utilização dos mesmos. Consoante o tipo de enzima considerado, estas podem aumentar a disponibilidade de nutriente da planta, que estejam protegidos pelos componentes estruturais das paredes celulares vegetais (McDonald, 2002).

### **Enzimas exógenas em avicultura**

As aves são as espécies que mais parecem beneficiar do uso de enzimas exógenas, possivelmente por possuírem um sistema digestivo muito curto, não permitindo um tempo suficiente de digestão (Mavromichalis, 2012). Bedford et al. (1998), referiu que as aves têm uma mais rápida taxa de passagem em relação aos suínos, 2-4h vs 12-24h e só a fase gástrica dura 20-45min vs 4-8h, respectivamente. As aves também apresentam uma menor humidade no intestino delgado, 16-20% MS vs 7-10% MS. Após enumeradas as diferenças, as aves apresentam, sem dúvida, uma maior viscosidade na digesta intestinal em relação aos suínos para o mesmo tipo de alimento. Assim sendo, as aves produzem sucos intestinais duas vezes mais concentrados que as dos suínos (Bedford et al., 1998), possivelmente para compensar a alta viscosidade.

Hoje em dia, é indispensável na produção avícola, o uso de enzimas exógenas como um elemento integrante das dietas (Khattak et al., 2006). Existem, portanto, uma panóplia de enzimas exógenas, no qual são específicos para um determinado substrato/matéria-prima.

Quadro 5- Tipos de enzimas alimentares, substrato e matéria-prima (Adapatado de Ravindran, 2010)

<b>Enzimas</b>	<b>Substrato</b>	<b>Matéria-prima</b>
Xilananases	(Arabino-)xilanos	Trigo, centeio, triticales, cevada e fibra vegetal
$\beta$ -glucanases	$\beta$ -glucanos	Centeio, cevada e aveia
Amilases	Amido	Milho, trigo e leguminosas
Proteases	Proteínas	Fontes de proteína vegetal
Fitases	Ácido Fítico	Alimentos de origem vegetal

Vários estudos referem que o papel das xilananases é o de hidrolisar os PNA, diminuindo o tamanho da cadeia dos PNA, resultando no decréscimo da viscosidade do digesta (Mendes et al., 2013; Santos et al., 2013). Esta redução de viscosidade traduz-se numa melhor digestão e absorção dos nutrientes, permitindo assim, a incorporação de fontes de energia alternativas que sejam mais baratas, enquanto promove o crescimento animal (Choct, 2006; Figueiredo et al., 2012). Choct (2006) ainda afirma que, ao adicionar xilananases às dietas, remove o amido e outros nutrientes encapsulados na parede celular da planta.

Ao serem adicionadas, estas enzimas provocam a quebra das cadeias dos PNA em polímeros mais simples, diminuindo a sua capacidade de retenção de água e, consequentemente, reduzindo a viscosidade dos conteúdos digestivos (Choct, 1997; Mendes et al., 2013). Assim, há uma maior disponibilidade, digestibilidade e absorção dos nutrientes, especialmente em proteína e gordura, melhorando também a energia metabolizável aparente (EMA). Aumentando o ganho de peso e melhorando o índice de conversão alimentar, chegando a diminuir o tamanho do sistema digestivo (Khattak et al., 2006; Wu et al., 2004).

Segundo Bedford et al. (1998), a adição de amilases e proteases exógenas nas dietas têm revelado ser benéficas tanto para aves como suínos. Em animais muito jovens, a amilase melhora a digestibilidade do amido (Khattak et al., 2006), da matéria orgânica, energia metabolizável aparente (EMA) da dieta, bem como o índice de conversão alimentar (Gracia et al., 2003; Kaczmarek et al., 2014; Yin et al., 2018). Isaksen et al. (2010) afirma que estes resultados são independentes da idade da ave, podendo também as aves com maior idade beneficiar do uso da amilase exógena. Noy et al. (1999), ainda sugere que a amilase exógena tem um importante papel no aumento da produção pancreática em aves jovens.

As enzimas que degradam proteínas, as proteases, são características pela sua habilidade em hidrolisar aminoácidos específicos. Estas enzimas adicionadas às dietas dos frangos aumentam a taxa de hidrólise proteica das mesmas, permitindo a melhoria na

utilização de azoto, reduzindo a produção de amoníaco e também a sua excreção (Oxenboll et al., 2011; Khattak et al., 2006). A melhor utilização do azoto por parte da ave, é uma possibilidade para reduzir o conteúdo proteico na dieta, reduzindo, ainda mais o desperdício e a excreção de azoto. Assim sendo, irá reduzir possíveis riscos de saúde e impactos ambientais, como a acidificação e eutrofização. Mas também apresenta aumentos no ganho de peso da ave, traduzindo-se num IC menor (Isaksen et al., 2010). Segundo Ghazi et al. (2002), as proteases podem aumentar a produção da peptidase endógena, melhorando a digestibilidade proteica da dieta. Além disso, as proteases podem hidrolisar fatores antinutritivos baseados em proteínas (lectinas ou inibidores de tripsina), melhorando a eficiência da ave na utilização dos aminoácidos (Jacob, 2015).

O uso da fitase como suplemento alimentar, melhora a digestão do fitato fosforoso, reduzindo a excreção de fósforo pela ave (Choct, 2006; Khattak et al., 2006; Slominski, 2011). Esta excreção de fósforo poderá ter um forte impacto ambiental, como a eutrofização. Isto acontece, pois grande parte do fósforo está armazenado dentro da parede celular da planta, sendo que é indigestível pelos monogástricos.

A fitase, enquanto liberta o fósforo da dieta, também chega a libertar outros minerais, entre eles, o cálcio, o zinco e o magnésio (Acosta et al., 2006; Khattak et al., 2006; Greiner et al., 2010), bem como proteína e aminoácidos ligado ao fitato (Khattak et al., 2006), melhorando também a performance do animal, bem como o índice de conversão alimentar (Choct, 2006). Por isso, o uso de fitase permite uma menor inclusão de fósforo inorgânico na dieta (Bedford et al., 1998).

A adição da fitase aparenta ser benéfica em dietas com baixo teor de fósforo, melhorando a utilização dos nutrientes e a performance dos animais, mas o seu efeito é menos pronunciado em dietas com o teor adequado em fósforo. E segundo Greiner et al. (2010), a interação de fitato-proteína pode induzir mudanças na estrutura da proteína podendo diminuir a atividade enzimática, solubilidade proteica e digestibilidade proteolítica. Greiner et al. (2010), ainda referiu que a disponibilidade de aminoácidos melhora com o decréscimo dos níveis de fitato. Mas estas diferenças entre estudos, o autor diz que parte se deve ao uso de diferentes fontes proteicas.

A maioria das misturas enzimáticas comerciais contém um espectro de diferentes enzimas (Marquardt et al., 1996), de forma a atuarem em diferentes substratos constituintes da dieta. Segundo Khattak et al. (2006), há que ter em atenção que, a taxa de catálise de uma enzima numa reação vai diminuindo à medida que a concentração do seu substrato é menor, até ao ponto em que deixa de haver essa resposta. Nesse momento, considera-se que a enzima se encontra saturada. Daí ser muito importante, que a quantidade de enzima

suplementada num regime alimentar corresponda à quantidade de substrato a hidrolisar aí presente.

A utilização das enzimas na alimentação de aves, não só representa um melhor valor nutricional dos alimentos, mas também permite incrementar o uso de possíveis matérias-primas. Assim, oferece maior escolha de alimentos e melhores lucros ao produtor (Acosta et al., 2006).

## 5. Estado de arte

A enzima exógena, protease foi concebida para a hidrólise proteica, maximizando a utilização do azoto e se necessário, diminuindo o teor proteico das dietas. Geralmente, o modo de ação da protease é a melhoria da digestibilidade da proteína e dos aminoácidos, a partir da hidrólise dos mesmos e também é de destacar a hidrólise dos fatores antinutricionais (lectina e inibidores de tripsina) que leva a uma melhor utilização do azoto. Quando as aves utilizam melhor o azoto, é uma possibilidade para diminuir o teor proteico na dieta e também reduzir a quantidade de azoto no excreta.

O milho é o cereal que domina o mercado ocidental da alimentação de aves e estas dietas, normalmente, são complementadas com bagaço de soja. Ainda que seja uma boa combinação, a adição de enzimas irá melhorar a eficiência de crescimento ou a saúde do animal, bem como a redução na contaminação ambiental. A maioria dos estudos de proteases são em simultâneo com outras enzimas como as amilases, xilanases e glucanases (Marsman et al., 1997; Zanella et al., 1999; Toledo et al., 2007; Troche et al., 2007; Cowieson et al., 2008; Raczmarek et al., 2014; Nunes et al., 2015), pois através do uso destas misturas é possível conseguir uma simbiose, onde as carbohidrases decompõem os compostos fibrosos da parede celular, onde a amilase e a protease podem melhor atuar sobre o seu substrato.

Zanella et al. (1999) mostraram que a suplementação de uma dieta à base de milho e soja extrudida com misturas enzimáticas contendo xilanase, amilase e protease promoveu um aumento da digestibilidade de nutrientes e dos parâmetros produtivos dos frangos de carne, a partir da degradação da parede celular dos polisacáridos, ao mesmo tempo que permitiu reduzir a energia de formulação da dieta. Já Cowieson et al. (2008), nas mesmas condições anteriores, promoveu a disponibilidade de energia e de aminoácidos, reduzindo custos enquanto mantém a performance dos frangos de carne. Nunes et al. (2015) demonstrou que a suplementação de xilanase, glucanase, celulase, pectinase em dietas de milho e bagaço de soja com baixa densidade em energia, cálcio e fósforo beneficia os frangos de carne nas fases iniciais de vida, mantendo, nessa fase, a mesma performance que as dietas convencionais sem suplementação. Já Toledo et al. (2007), demonstrou que a suplementação de xilanase, glucanase, celulase, pectinase e protease em dietas de milho e bagaço de soja com baixa densidade em energia, proteína e aminoácidos essenciais obteve uma performance mais baixa que as dietas convencionais sem suplementação.

Alguns estudos (Thacker, 2005; Yu et al., 2007; Oxenboll et al., 2011) demonstram os efeitos positivos da protease, como único suplemento enzimático, em dietas à base de milho

e soja. Estudos realizados (Yu et al., 2007; Oxenboll et al., 2011) mostram que a suplementação de protease em dietas de milho e bagaço de soja, com baixo teor em PB são mais eficazes do que dietas convencionais sem suplementação.

## **6. Objetivos**

A protease em dietas à base de milho e bagaço de soja, normalmente, está inserido dentro de uma mistura de suplementação enzimática. Alguns autores defendem que em combinação com outras enzimas, é mais representativo o benefício da protease. O benefício no seu uso traduz-se na melhoria da digestibilidade da proteína e dos aminoácidos, melhorando a performance da ave. Poucos autores, utilizaram a protease como única enzima, ainda assim, alguns conseguiram resultados mais satisfatórios, onde houvesse menor concentração de proteína bruta.

Neste estudo, é pretendido avaliar o efeito da adição da protease, como único suplemento enzimático, nos índices zootécnicos dos frangos de carne em dietas à base de milho e bagaço de soja. Também pretende averiguar o efeito da suplementação da protease entre dietas com diferentes concentrações proteicas.

## **Capítulo III- Materiais e Métodos**

### **1. Instalação das Aves**

O ensaio foi realizado numa sala destinada à investigação avícola das instalações da Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia. A sala de 29,7m<sup>2</sup>, teve uma temperatura e ventilação controlada durante os 35 dias de ensaio.

A sala estava equipada com 40 gaiolas com uma área de 2750cm<sup>2</sup>, dispostas em dois níveis com uma prancha inclinada por debaixo das gaiolas apontadas para o corredor central.

Cada gaiola possuía um comedouro fixo, e nos primeiros dias foi posto à disposição um tabuleiro de primeira idade com alimento, disposto no chão da gaiola, para facilitar o acesso do alimento aos pintos, bem como, para incentivar a procura e ingestão do alimento. Existe uma linha de água comum, com uma altura ajustável, com duas pipetas por gaiola. Para o aquecimento foram utilizadas lâmpadas de aquecimento de 150W (de altura fixa).

A sala foi limpa e desinfectada 72 horas antes da chegada dos pintos do dia. Vinte e quatro horas antes da chegada dos pintos, a sala foi montada, de modo a estar apta para o acolhimento dos animais, também toda a qualidade do equipamento foi verificada e testada, uma última vez. As gaiolas foram etiquetadas conforme o tratamento que cada grupo de animais iria receber. A sala foi aquecida, de modo que, no dia seguinte a temperatura estivesse entre os 28-29 °C.

As aves seleccionadas para este ensaio, foram 200 pintos do dia, machos da estirpe Ross 308. Para manter uma área adequada por ave nas gaiolas, na mudança de fase, os animais foram pesados, e o mais leve foi removido do ensaio. O número de aves por gaiola, na fase de iniciação foram 5; na fase de crescimento foram 4 e na fase de acabamento foram 3.

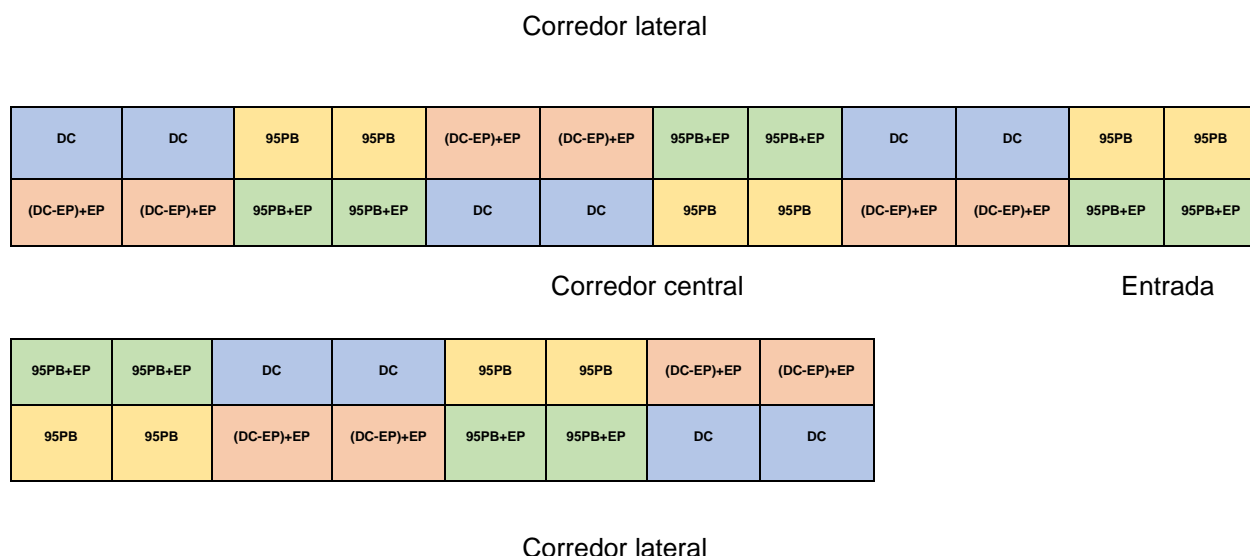
### **2. Alimento composto concentrado**

Neste ensaio foram testados quatro tratamentos experimentais que foram replicados 10 vezes e distribuídos de forma aleatória, como ilustrado na Figura 4.

Os tratamentos foram divididos em três fases: fase de iniciação, crescimento e acabamento. Deste modo, foram fabricadas três variantes de cada um dos tratamentos, de acordo com as formulações apresentadas no Quadro 6.



Figura 4- Disposição dos quatro tratamentos na sala



Quadro 6- Tratamentos Experimentais

Tratamento	Descrição
DC	Dieta controlo <sup>1</sup>
95PB	95% PB e AA da dieta controlo <sup>2</sup>
95PB+EP	95% PB e AA+ 130 g/T Enzima Protease (EP) <sup>3</sup>
(DC-EP)+EP	Dieta controlo– Contribuição PB e AA EP + 130 g/T EP <sup>4</sup>

<sup>1</sup>As necessidades energéticas e proteicas foram definidas consoante os padrões locais.

<sup>2</sup>As necessidades proteicas e de aminoácidos foram reduzidas em 5% em relação à dieta controlo.

<sup>3</sup>Equipara-se ao tratamento 95PB com a adição de 0,013% da Enzima Protease.

<sup>4</sup>Reduziu-se o nível proteico da dieta controlo correspondente à contribuição de PB e AA da Enzima protease, com a adição de 0,013% da Enzima Protease.

O ensaio experimental ocorreu durante 35 dias, dividido em três fases de crescimento: a fase de iniciação (0-12 dias); fase de crescimento (12-25 dias); fase de acabamento (25-35 dias). O alimento na fase de iniciação foi apresentado às aves, em forma de farinha, enquanto que nas duas fases seguintes, o alimento foi apresentado em granulado (pellet). Nas diferentes fases, a ração apresentada às aves, também diferia entre fases, como mostra o Quadro 7.

Os tratamentos abaixo mencionados foram preparados na fábrica de rações na Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia. Após o fabrico das dietas foi recolhida uma amostra representativa dos lotes para análise da sua composição.

Quadro 7- Composição centesimal<sup>1</sup> e nutricional<sup>1</sup> dos diferentes tratamentos experimentais<sup>2</sup>

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL									
	DC			95PB e 95PB+EP			(DC-EP)+EP		
Ingrediente (%)	Inic.	Cresc.	Acab.	Inic.	Cresc.	Acab.	Inic.	Cresc.	Acab.
Milho	63,400	64,750	70,445	66,255	67,428	72,870	64,812	66,258	71,845
Bag. soja, 47% <sup>1</sup>	30,854	23,056	18,174	28,392	20,677	16,11	29,655	22,210	17,000
Soja tostada	0	7,54	7,00	0	7,61	7,00	0	7,00	7,00
Óleo de soja	1,205	0,990	1,220	0,820	0,605	0,882	1,000	0,850	1,020
DL Metionina <sup>1</sup>	0,381	0,312	0,250	0,360	0,300	0,235	0,377	0,312	0,245
Lisina HCL <sup>1</sup>	0,335	0,230	0,260	0,330	0,235	0,263	0,326	0,230	0,260
Carb. cálcio <sup>1</sup>	1,230	1,057	0,970	1,233	1,060	0,970	1,235	1,060	0,970
Fosfato dicálcico	1,945	1,435	1,070	1,960	1,455	1,060	1,945	1,450	1,050
Pré-mistura <sup>3</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Sal	0,350	0,330	0,311	0,350	0,330	0,310	0,350	0,330	0,310
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL									
EM <sup>1</sup> (Kcal/kg)	3050	3130	3200	3050	3131	3201	3050	3130	3200
MS <sup>1</sup> (%)	84,12	84,86	85,28	84,00	84,78	85,19	84,04	84,83	85,24
PB <sup>1</sup> (%)	20,40	19,20	17,00	19,39	18,24	16,16	19,92	18,74	16,52
Lisina disp. <sup>1</sup> (%)	1,22	1,11	1,00	1,16	1,06	0,95	1,19	1,08	0,96
Met. disp. <sup>1</sup> (%)	0,68	0,61	0,52	0,65	0,58	0,49	0,67	0,59	0,51
Ca <sup>1</sup> (%)	0,95	0,78	0,65	0,95	0,78	0,65	0,95	0,78	0,65
P disp. <sup>1</sup> (%)	0,47	0,38	0,30	0,47	0,38	0,31	0,47	0,38	0,30

<sup>1</sup> Bag. Soja, 47%- Bagaço de Soja 47%PB; DL Metionina (DL-Methionine 99%); Lisina HCL (L-Lysine HCL 99%); Carb. Cálcio- Carbonato de cálcio; EM- Energia Metabolizável; MS- Matéria Seca; PB- Proteína Bruta; Lisina disp.- Lisina disponível; Met. Disp.- Metionina disponível; Ca- Cálcio; P. disp.- Fósforo disponível

<sup>2</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

<sup>3</sup>Pré-mistura fornece por quilograma de dieta: ácido pantotênico 10 mg, vitamina D3 2400 IU, cianocobalamina 0,02 mg, ácido fólico 1 mg, vitamina K3 2 mg, ácido nicotínico 25 mg; vitamina B6 2 mg, vitamina A 10000 UI, vitamina B1 2 mg, vitamina E 30 mg, vitamina B2 4 mg, Cu 8 mg, Fe 50 mg, I 0,7 mg, Mn 60 mg, Se 0,18 mg, Zn 40 mg; ethoxyquin 1,5 mg; 6-fitase EC 3.1.3.26 1500000 FYT.

### 3. Maneio dos pintos

No início do ensaio, os animais passaram por um processo de pré-seleção, os que não aparentassem estar doentes ou ter lesões visíveis a olho nú e que tivessem um peso entre os 45 e os 55 gramas, de forma a garantir uma boa homogeneidade do bando, foram escolhidos. Após a seleção foram anilhados e dispostos nas gaiolas aleatoriamente.

A temperatura e a ventilação da sala foram controladas através de registos diários. A temperatura era medida com um termómetro no centro da sala à altura das gaiolas do nível superior e outro na parede oposto à entrada. Estes parâmetros foram ajustados sempre que necessário para manter o bem-estar dos pintos, de acordo com o comportamento dos mesmos e as recomendações da estirpe (Aviagen, 2014).

Durante todo o ensaio, os animais foram alimentados *ad libitum*, para garantir a disponibilidade de alimento, o nível de alimento foi verificado duas vezes por dia. O alimento foi fornecido e registado diariamente. Semanalmente e na mudança de fase (no 7º, 12º, 14º, 21º, 25º, 28º e no 35º dia) eram pesados os refugos alimentares e os frangos de carne, permitindo assim, poder ser calculado a ingestão de alimento, o ganho de peso e consequentemente, o índice de conversão.

As aves foram observadas diariamente, procurando qualquer variação na sua aparência física, no excreta ou até mesmo no seu comportamento, tentar perceber se havia recusa do alimento. A verificação da mortalidade foi efectuada diariamente, e se um animal estivesse em más condições e considerado em estado de saúde além da recuperação, seria abatido e uma possível causa de abate será anotada. Todas as aves mortas e abatidas tiveram o seu peso e a data de óbito registada. A altura dos bebedouros, foi sendo ajustada ao longo do tempo, acompanhando o crescimento dos frangos de carne.

Após os 35 dias de ensaio experimental, a ave com o peso mediano foi abatida, de modo a ter uma amostra mais homogénea de cada gaiola. No processo de abate, os frangos sofreram um atordoamento de 90V e posterior deslocamento cervical. Recolheram-se para tubos de centrifugação, os conteúdos digestivos misturados do duodeno e jejuno e do conteúdo do íleo à parte, para cálculo das respectivas viscosidades. Também se procedeu à pesagem do papo, moela, pâncreas, fígado, duodeno, jejuno, íleo e cecos, e ainda, a medição do comprimento do duodeno, jejuno, íleo e cecos. Antes da pesagem e/ou da medição do comprimento, os órgãos foram esvaziados, lavados e secos devidamente.

#### **4. Procedimentos analíticos**

As análises realizadas aos regimes alimentares e aos conteúdos digestivos dos frangos de carne foram executadas no Laboratório Professor Pais de Azevedo.

Quanto aos regimes alimentares, foram retiradas amostras dos lotes do alimento composto preparado, para calcular a energia bruta, matéria seca, cinza, proteína bruta, fibra bruta (FB), gordura bruta (GB) e os extratos não azotados (ENA).

Na determinação da energia bruta 1 g ( $\pm 0,1$  mg) da amostra do alimento foi colocada num calorímetro *PARR 1261* até à sua combustão total. A pastilha com a amostra foi queimada na bomba calorimétrica, e calculou-se os valores calóricos das amostras.

Na determinação da matéria seca pesou-se uma cápsula e nela colocou-se um mínimo de 1 g ( $\pm 0,1$  mg) de amostra. A amostra secou até peso constante numa estufa a 103 °C durante a noite (cerca de 16 horas). Após este período, a amostra foi colocada num exsicador para arrefecer. Posteriormente, foi pesada a cápsula e retirado o peso da matéria seca.

Para a determinação da cinza utilizou-se a mesma cápsula com a amostra da determinação da matéria seca. A amostra foi incinerada a 550 °C na mufla durante um mínimo de 3 horas, controlando-se de modo a se obter uma cinza branca. Após a incineração, a amostra foi transferida para a estufa pré-aquecida a 103 °C durante uma hora. Posteriormente, a amostra foi colocada num exsicador para arrefecer e pesada após atingir a temperatura ambiente.

A proteína bruta das amostras dos alimentos foi determinada segundo o método de Kjeldahl. Para tal foi utilizado um equipamento com sistema Kjelttec semiautomático. A determinação da PB ocorreu em três fases. A primeira foi a digestão, colocou-se juntamente com 1g de amostra, 2 Kjeltab, e 15 ml de ácido sulfúrico, e de seguida colou-se na unidade de 20 destilação a 400 °C até a solução ficar límpida (60 min). A segunda fase foi a destilação, o tubo de kjeldahl com a solução foi colocado na unidade de destilação que juntou água destilada e 50 ml de solução NaOH a 50%. A solução foi destilada, o destilado foi recolhido em ácido bórico a 1% com indicador, e por fim, foi realizada uma titulação com solução HCl 0,1N.

A fibra bruta das amostras dos alimentos foi determinada segundo o método de Weende. Para tal foi utilizado um equipamento com sistema Fibertec. A determinação da FB ocorreu em quatro fases. A primeira é realizada na unidade de extração a quente, colocou-se 1g da amostra ( $W_0$ ) em cadinhos filtrantes. Após aquecimento, junta-se 150 ml de solução 1,25% de ácido sulfúrico e deixar arrefecer 30 minutos. Filtrar e lavar três vezes com água destilada quente. Juntar 150 ml de solução 1,25% NaOH, previamente aquecida e deixar arrefecer 30 minutos. Filtrar e lavar três vezes com água destilada quente. A segunda é realizada na unidade de extração a frio, onde se colocam os cadinhos, lavam-se três vezes com acetona e retira-se o excesso por sucção. Na terceira fase, secam-se os cadinhos a 104°C durante a noite. Deixar arrefecer num exsicador e pesa-se ( $W_1$ ). Coloca-se os cadinhos numa mufla a 550°C durante 3 horas e deixar arrefecer num exsicador e pesa-se ( $W_2$ ).

O cálculo do conteúdo da amostra em fibra bruta é determinado, a partir da seguinte equação:

$$FB = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100\%$$

A determinação da gordura bruta dos alimentos e fezes foi feita através de duas etapas: hidrólise e extracção. A hidrólise foi realizada num sistema de hidrólise Soxtec, pesou-se previamente 3 g de amostra para um tubo, juntou-se celite e 100 ml de HCl 3M e deixou-se a ferver durante 60 minutos. De seguida, procedeu-se à filtração automática. Os cadinhos filtrantes foram depois colocados a 60 °C durante a noite. Na segunda etapa, a extracção, colocou-se a amostra na unidade de extracção de gordura a 110 °C, juntamente com copos de alumínio previamente pesados e com 40 ml de éter de petróleo. O cadinho contendo a amostra foi colocado no copo de alumínio onde ficou imerso durante 30 minutos, retirou-se depois durante uma hora, de seguida recuperou-se o éter e fez-se a evaporação. O copo de alumínio foi retirado e colocado numa estufa a 60 °C durante o período da noite, e de seguida fez-se a respectiva pesagem.

O cálculo dos extratos não azotados é determinado, a partir da seguinte equação:

$$ENA = MS - (Cinzas + PB + FB + GB)$$

Após o abate dos frangos, foram recolhidas amostras dos conteúdos digestivos para que, de seguida, fosse determinada a sua viscosidade. As amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, durante 10 minutos, tendo-se depois recolhido o sobrenadante, do qual se mediu a viscosidade. A viscosidade foi obtida através de leitura direta com um viscosímetro *Brookfield viscometer (Model LVDVCP-II)*, *Brookfield Engineering Laboratories Middleboro, MA* a 6 rpm, acoplado a um banho maria que manteve as amostras a uma temperatura constante de 25 °C.

## 5. Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo à análise de variância usando o procedimento General Linear Models do programa estatístico SAS (SAS, 2001). Médias com valor de F significativos ( $P < 0,05$ ) foram comparadas usando o teste de Duncan. Diferenças entre médias foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## Capítulo IV- Resultados

### 1. Composição dos regimes alimentares

Após o fabrico dos tratamentos foi efectuada uma análise da sua composição para se verificar os níveis de energia bruta, matéria seca, cinza, proteína bruta, fibra bruta, gordura bruta e extratos não azotados. O resultado da análise apresenta-se no Quadro 8.

Quadro 8- Análises efetuadas para os diferentes tratamentos<sup>1</sup> experimentais nas fases de iniciação, crescimento e de acabamento.

NUTRIENTE	DC			95PB e 95PB+EP			(DC-EP)+EP		
	Inic.	Cresc.	Acab.	Inic.	Cresc.	Acab.	Inic.	Cresc.	Acab.
MS <sup>2</sup> (%)	90,6	89,5	89,4	90,9	89,6	89,1	90,4	89,6	89,6
EB <sup>2</sup> (kcal/kg)	4655	4661	4674	4470	X	4676	4551	4668	4523
PB <sup>2</sup> (%)	19,9	18,1	16,3	18,8	17,8	15,4	19,5	18,2	15
Cinza (%)	5,4	4,7	4,0	5,0	4,4	3,9	5,2	4,3	4,3
FB <sup>2</sup> (%)	3,9	4,6	3,9	3,3	3,7	3,1	4,0	3,5	3,0
GB <sup>2</sup> (%)	4,7	5,8	6,2	4,3	5,6	5,7	4,5	5,6	6,0
ENA <sup>2</sup> (%MS)	56,7	56,4	59,0	59,3	58,2	60,9	57,2	58,1	61,3

<sup>1</sup>DC representa a dieta controlo; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controlo; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

<sup>2</sup> MS- Matéria Seca; EB- Energia Bruta; PB- Proteína Bruta; FB- Fibra bruta; GB-Gordura bruta

Pela observação dos valores obtidos, não se verificou diferenças significativas na composição em energia e proteína bruta dos diferentes tratamentos em relação aos valores esperados. Para os restantes parâmetros, também não se verificou diferenças significativas entre os valores esperados e os valores obtidos.

### 2. Peso vivo

O peso vivo dos animais foi registado no início do ensaio, semanalmente e na mudança de fase/idade até ao final do ensaio. No quadro seguinte encontram-se os valores referentes às médias de PV registadas por tratamento, ao longo das semanas de ensaio (Quadro 9) e, separadamente, durante o período de iniciação, de crescimento e acabamento (Quadro 10).

Quadro 9- Peso vivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (g/ave)

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>0 d (n=5)</b>	48,4	48,9	48,0	48,5	0,200	0,466
<b>7 d (n=5)</b>	201,1	201,7	203,4	202,5	1,088	0,896
<b>14 d (n=4)</b>	498,0	487,8	491,7	494,4	3,071	0,693
<b>21 d (n=4)</b>	947,5 <sup>a</sup>	898,3 <sup>b</sup>	914,6 <sup>ab</sup>	929,3 <sup>ab</sup>	6,386	0,042
<b>28 d (n=3)</b>	1507,6 <sup>a</sup>	1409,3 <sup>b</sup>	1441,8 <sup>ab</sup>	1481,9 <sup>a</sup>	11,973	0,018
<b>35 d (n=3)</b>	2095,6 <sup>a</sup>	1995,5 <sup>b</sup>	2014,1 <sup>ab</sup>	2083,1 <sup>ab</sup>	15,224	0,044

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

n representa o número de aves por gaiola

a-b Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Pela observação dos valores, verifica-se que no dia 0, o PV dos pintos do dia distribuídos pelos quatro tratamentos não difere, não havendo vantagem inicial para nenhum dos tratamentos. Aos dias 7 e 14, o PV dos pintos continua a ser semelhante. No dia 28, o PV dos frangos sujeitos ao tratamento (DC-EP)+EP foi superior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento 95PB, mas não difere dos resultados obtidos para os animais sujeitos aos tratamentos DC e 95PB+EP. Nos dias 21 e 35, o PV dos frangos submetidos ao tratamento (DC-EP)+EP foi semelhante aos restantes tratamentos. Entre os dias 21 e 28, as dietas deficitárias em 5% de proteína bruta e aminoácidos teve uma descida significativa de performance, que foi corrigida com a adição da enzima protease na última semana do ensaio.

Quadro 10- Peso vivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (g/ave), durante o período de iniciação (0-12 dias), de crescimento (12-25 dias) e de acabamento (25-35 dias).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>0 d (n=5)</b>	48,4	48,9	48,0	48,5	0,200	0,466
<b>12 d (n=5)</b>	389,2	388,4	391,9	394,4	2,350	0,797
<b>25 d (n=4)</b>	1259,8 <sup>a</sup>	1187,3 <sup>b</sup>	1209,8 <sup>ab</sup>	1235,1 <sup>ab</sup>	8,924	0,024
<b>35 d (n=3)</b>	2095,6 <sup>a</sup>	1995,5 <sup>b</sup>	2014,1 <sup>ab</sup>	2083,1 <sup>ab</sup>	15,224	0,044

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

n representa o número de aves por gaiola

a-b Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Na fase de iniciação, não existem diferenças entre os quatro tratamentos ( $P > 0,05$ ). Já durante a fase de crescimento e a fase de acabamento, notou-se que os frangos sujeitos aos

tratamentos com déficit em proteína bruta e em aminoácidos, tiveram perdas significativas de performance em relação à dieta controlo que foram corrigidas com a suplementação da enzima protease.

### 3. Ganho médio diário de peso

Com o registo do peso vivo dos frangos é possível saber o ganho médio diário (GMD) de peso numa determinada fase. Os GMD de peso determinados são apresentados no Quadro 11.

Quadro 11- Ganhos médio diário de peso total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (g/ave).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>0-12 d (n=5)</b>	28,4	28,3	28,7	28,8	0,192	0,752
<b>12-25 d (n=4)</b>	67,0 <sup>a</sup>	61,5 <sup>b</sup>	62,9 <sup>b</sup>	64,7 <sup>ab</sup>	0,618	0,010
<b>25-35 d (n=3)</b>	83,6	80,1	80,6	84,8	0,905	0,190
<b>0-35 d</b>	58,5 <sup>a</sup>	55,6 <sup>b</sup>	56,2 <sup>ab</sup>	58,1 <sup>a</sup>	0,435	0,043

<sup>1</sup>DC representa a dieta controlo; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controlo; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

n representa o número de aves por gaiola

a-b Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Na fase de iniciação e na fase de acabamento, não existem diferenças entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Na fase de crescimento, os frangos sujeitos ao tratamento 95PB+EP tiveram GMD de peso inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos frangos sujeitos aos tratamentos DC, mas não difere dos valores obtidos pelo tratamento 95PB e (DC-EP)+EP. Já os frangos sujeitos ao tratamento (DC-EP)+EP tiveram GMD de peso semelhantes aos restantes tratamentos.

Em suma, avaliando o ensaio como um todo, os frangos sujeitos ao tratamento (DC-EP)+EP possuem GMD de peso superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos frangos sujeitos ao tratamento 95PB, mas não diferem dos valores obtidos para os tratamentos DC e 95PB+EP. Já os frangos sujeitos ao tratamento 95PB possuem GMD de peso inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos frangos sujeitos aos tratamentos DC e (DC-EP)+EP 95PB, mas não diferem dos valores obtidos para o tratamento 95PB+EP.



#### 4. Alimento ingerido

O alimento adicionado diariamente aos comedouros foi registado e o seu refugo pesado no final de cada fase. Dessa forma, foi possível calcular a ingestão de cada gaiola e, portanto, a ingestão média individual. No quadro seguinte apresentam-se os dados correspondentes às ingestões médias individuais entre as diferentes fases, bem como a ingestão total ao longo do ensaio (Quadro 12), por tratamento.

Quadro 12- Ingestão individual total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (g/ave).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>0-12 d (n=5)</b>	456,5	462,6	467,2	467,2	2,500	0,391
<b>12-25 d (n=4)</b>	1235,4	1227,4	1236,7	1277,4	14,209	0,614
<b>25-35 d (n=3)</b>	1523,9	1542,2	1525,6	1552,5	17,657	0,935
<b>0-35 d</b>	3215,8	3232,1	3229,5	3297,2	29,311	0,778

<sup>1</sup>DC representa a dieta controlo; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controlo; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

n representa o número de aves por gaiola

Ao nível da ingestão de alimento não se verificam diferenças entre tratamentos ( $P>0,05$ ).

#### 5. Índice de conversão

O índice de conversão consiste na relação entre o aumento de peso vivo e a quantidade de alimento ingerido. Os valores relativos aos IC calculados para as fases de iniciação, crescimento e acabamento, bem como a total (Quadro 13), estão apresentados de seguida.

Quadro 13- Índice de conversão total e entre fases dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos.

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>0-12 d (n=5)</b>	1,34	1,36	1,36	1,35	0,011	0,898
<b>12-25 d (n=4)</b>	1,42 <sup>b</sup>	1,54 <sup>a</sup>	1,52 <sup>a</sup>	1,52 <sup>a</sup>	0,017	0,048
<b>25-35 d (n=3)</b>	1,83 <sup>c</sup>	1,91 <sup>a</sup>	1,89 <sup>ab</sup>	1,84 <sup>bc</sup>	0,012	0,027
<b>0-35 d</b>	1,57 <sup>b</sup>	1,66 <sup>a</sup>	1,64 <sup>a</sup>	1,62 <sup>ab</sup>	0,011	0,016

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

n representa o número de aves por gaiola

a-b-c Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Na fase de iniciação, não se verifica diferenças significativas entre tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Na fase de crescimento e na fase de acabamento, os frangos sujeitos aos tratamentos 95PB e 95PB+EP tiveram IC superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento DC. Já os frangos sujeitos ao tratamento (DC-EP)+EP tiveram IC superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento DC na fase de crescimento, mas recuperaram a performance na fase de acabamento, onde não houve diferenças no IC entre estes dois tratamentos. Devido à melhoria na fase de acabamento, no geral não houve diferenças significativas entre o tratamento (DC-EP)+EP e a dieta controle.

## 6. Mortalidade

Em 200 exemplares, a mortalidade dos frangos neste ensaio foi de 1,5% e não foi influenciada pelos diferentes tratamentos (Quadro 14).

Quadro 14- Número de frangos mortos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> para os períodos de iniciação, crescimento e de acabamento.

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP
<b>0-12 d (n=5)</b>	-	-	-	-
<b>12-25 d (n=4)</b>	-	-	-	1
<b>25-35 d (n=3)</b>	-	1	1	-

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

<sup>2</sup>n representa o número de aves por gaiola

## 7. Viscosidade dos conteúdos digestivos

A viscosidade dos conteúdos digestivos, recolhidos logo após o abate das aves, foi determinada diretamente através do viscosímetro. O quadro abaixo contém os resultados obtidos no final do ensaio (Quadro 13).

Quadro 15- Viscosidade do conteúdo digestivo dos frangos sujeitos aos diferentes tratamentos<sup>1</sup> (cpo).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>Duodeno+jejuno</b>	6,35	5,19	5,29	5,28	0,322	0,543
<b>Íleo</b>	4,02	3,83	3,96	3,57	0,183	0,838

<sup>1</sup>DC representa a dieta controlo; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controlo; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

Ao nível da viscosidade do conteúdo digestivo do duodeno e jejuno combinado e do íleo não se verificam diferenças entre tratamentos ( $P>0,05$ ).

## 8. Dimensões dos órgãos do sistema digestivo

Após o abate, retirou-se na totalidade o digesta do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e cecos, que foram seguidamente lavados e secos para que se pudesse pesá-los. Também se determinou o peso do fígado e pâncreas. O comprimento do duodeno, jejuno, íleo e cecos foram igualmente registados. Os valores apresentados nos quadros seguintes são valores relativos ao PV do respetivo animal (Quadro 16 e 17).

Quadro 16- Peso relativo dos órgãos do sistema digestivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (g/kg PV).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>Papo</b>	2,15	2,08	2,17	2,19	0,062	0,934
<b>Moela</b>	12,50	11,91	12,02	11,66	0,190	0,480
<b>Pâncreas</b>	2,27	2,08	1,86	2,03	0,054	0,053
<b>Fígado</b>	23,14	24,69	25,07	25,96	0,522	0,287
<b>Duodeno</b>	4,87	4,54	4,59	4,90	0,097	0,438
<b>Jejuno</b>	8,80	8,63	8,82	8,99	0,176	0,918
<b>Íleo</b>	7,92	7,86	7,14	7,98	0,230	0,556
<b>Cecos</b>	3,14	3,31	3,02	3,63	0,114	0,263

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

No final do ensaio, não se verificou diferenças significativas entre tratamentos para o peso relativo do papo, moela, pâncreas, fígado, duodeno, jejuno, íleo e cecos ( $P>0,05$ ).

Quadro 17- Comprimento relativo dos órgãos do sistema digestivo dos frangos alimentados com os diferentes tratamentos<sup>1</sup> (cm/kg PV).

	DC	95PB	95PB+EP	(DC-EP)+EP	SEM	p(F)
<b>Duodeno</b>	13,46	13,98	12,97	13,74	0,229	0,451
<b>Jejuno</b>	30,87	34,99	33,26	33,97	0,643	0,131
<b>Íleo</b>	32,94	33,72	33,04	34,26	0,552	0,825
<b>Cecos</b>	7,28	7,51	7,73	7,59	0,187	0,863

<sup>1</sup>DC representa a dieta controle; 95PB representa a redução em 5% PB e AA em relação à dieta controle; 95PB+EP representa a redução em 5% PB e AA em relação às padrão com adição de 0,013% Enzima Protease; (DC-EP)+EP representa redução do nível proteico da dieta basal correspondente à contribuição da Enzima Protease com posterior adição de 0,013% Enzima Protease.

Em relação, ao comprimento relativo do duodeno, jejuno, íleo e cecos não se verificam diferenças entre tratamentos ( $P>0,05$ ).

## Capítulo V- Discussão

Com este trabalho pretendia-se compreender melhor a suplementação com protease em rações de milho e bagaço de soja. Apenas o bagaço de soja contém inibidores de protease e de tripsina, que concretamente, indisponibilizam parte da proteína. Sabe-se que consideráveis quantidades de proteína passam pelo sistema digestivo sem chegarem a ser digeridos. Angel et al. (2011) afirma que através da suplementação de protease representa uma possibilidade para aumentar a digestibilidade proteica e de aminoácidos. Deste modo, melhorará a utilização de azoto e os índices zootécnicos dos frangos.

Existem vários estudos em que o uso da protease é combinado com outras enzimas, utilizando-se complexos multienzimáticos, e esses estudos têm obtido resultados muito variados e de algum interesse. Menos numerosos, são os trabalhos sobre o efeito exclusivo da protease sobre o milho e bagaço de soja.

O milho e o bagaço de soja foram os constituintes principais das rações utilizadas, sendo os inibidores de protease e de tripsina, os fatores antinutricionais que mais poderiam afetar as performances dos frangos. Como a enzima usada foi uma protease, os seus efeitos incidiram sobre as proteínas do milho, mas essencialmente na fração proteica do bagaço de soja. O uso de proteases permite uma hidrólise de aminoácidos específicos (Oxenboll et al., 2011). A redução da produção/excreção de amoníaco permite reduzir a produção de excreta, resultando numa diminuição da poluição ambiental. A diminuição desta excreção leva a uma redução de riscos de saúde e impactos ambientais, como a acidificação e a eutrofização (Isaksen et al., 2010).

Através do uso das proteases é também possível, diminuir a incorporação do conteúdo proteico na dieta, reduzindo, ainda mais o desperdício e a excreção de azoto. Também se obteve aumentos no ganho de peso das aves, traduzindo-se num índice de conversão menor (Isaksen et al., 2010).

Cowieson et al. (2008) referem que uma das melhores formas de estudar a resposta dos frangos à suplementação enzimática é através do ganho de peso, uma vez que a carne é o fator de interesse económico na produção avícola. Para este estudo, o PV inicial dos animais era idêntico, uma vez que se pretendia uniformidade de bandos e de tratamentos.

No presente estudo, não houve diferenças significativas para o peso vivo entre tratamentos até ao dia 21. A partir do dia 21 até ao final do ensaio, a adição de protease

melhorou a performance dos frangos sujeitos às dietas com baixo teor de proteína e de aminoácidos. Demonstrando que a protease usada foi suficiente para melhorar digestibilidade proteica. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Kaczmarek et al. (2014), no qual a adição de amilase, amiloglucanase e protease a uma dieta de milho e bagaço de soja não levou a diferenças significativas entre os tratamentos nas primeiras duas semanas da experiência. Também Nunes et al. (2015) verificaram que, durante o período de dia 1 a 22, uma dieta com baixo teor energético e mineral suplementada com mistura enzimática contendo protease teve o mesmo PV que a dieta controle não suplementada. Por outro lado, Yu et al. (2007) obtiveram frangos com PV mais elevados quando alimentados com dietas à base de milho e bagaço de soja suplementadas com protease em relação às dietas não suplementadas. Café et al. (2002) também verificaram que para a mesma dieta de milho e bagaço de soja, as dietas suplementadas com xilanase, amilase e protease tiveram melhores PV, ao dia 16 e dia 35.

Toledo et al. (2007) verificaram que, durante o período de dia 1 a 34, uma dieta com níveis reduzidos de energia, proteína bruta e aminoácidos suplementada com xilanase,  $\beta$ -glucanase, celulase, pectinase e protease teve PV inferiores em relação à dieta com níveis normais de energia, proteína bruta e aminoácidos não suplementada.

Relativamente aos valores obtidos para os ganhos de peso, na fase de iniciação e na fase de acabamento não houve diferenças significativas entre tratamentos. Já na fase de crescimento houve diferenças significativas entre a dieta controle e os tratamentos 95PB e 95PB+EP. Nesta mesma fase, o tratamento (DC-EP)+EP não teve diferenças significativas para com os restantes tratamentos. A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que a protease suplementada foi satisfatório para melhorar os ganhos de peso por parte do animal. Estes resultados estão igualmente de acordo com o estudo realizado por Kaczmarek et al. (2014), no qual a adição de amilase, amiloglucanase e protease a uma dieta de milho e bagaço de soja não levou a diferenças significativas entre os tratamentos nas primeiras duas semanas da experiência. Por outro lado, Cowieson et al. (2008), obtiveram frangos com ganhos de peso mais elevados quando alimentados com dietas à base de milho e bagaço de soja com níveis reduzidos de energia e aminoácidos suplementados com xilanase, amilase e protease em relação à dieta convencional. Zanella et al. (1999) também verificaram que para a mesma dieta de milho e bagaço de soja, quando suplementadas com xilanase, amilase e protease tiveram melhores ganhos de peso. Ainda numa segunda experiência, compararam uma dieta convencional a uma suplementada com xilanase, amilase e protease, onde era reduzido o teor energético correspondente à contribuição da mistura enzimática. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que a melhoria na utilização dos

nutrientes por parte da suplementação enzimática compensou completamente a redução do teor energético.

Neste estudo não se verificou nenhum efeito significativo da proteína bruta da ração, da suplementação enzimática com protease ou na interação entre a proteína da ração e a protease sobre a quantidade de alimento ingerido. Estes resultados estão igualmente de acordo com os estudos realizados por Cowieson et al. (2008), Oxenboll et al. (2011) e Kaczmarek et al. (2014), que para uma dieta de milho e bagaço de soja, uma dieta controle e outra de baixa densidade de energia ou proteína bruta suplementados enzimaticamente não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Cowieson et al. (2008) sugeriram que não havendo efeito da enzima na ingestão de alimento, a melhoria da performance dos animais observada deve-se a mudanças na digestibilidade de energia e aminoácidos, em vez de uma melhor ingestão de nutrientes digestíveis. Estas especulações são suportadas pela melhoria da energia metabolizável aparente, retenção de azoto e digestibilidade dos aminoácidos.

Yu et al. (2007), verificaram que, durante a fase de iniciação, a suplementação de carbohidrase e ou apenas protease numa dieta com baixo teor proteico teve ingestões inferiores a uma dieta não suplementada na estação quente. O autor explica que pode ser devido ao aumento da digestibilidade da proteína e disponibilidade dos aminoácidos devido à suplementação enzimática durante a estação quente. Simbaya et al. (1996) demonstraram que o excedente de aminoácidos na corrente sanguínea dos frangos alimentados com dietas ricas em proteína suplementadas com protease, resultou em falta de apetite. Os autores salientaram ainda que, a carbohidrase suplementada aumenta a utilização de energia na dieta. E sendo a energia, o maior regulador da ingestão de alimento, a sua melhor utilização contribuirá para a redução da ingestão de alimento.

Relativamente aos valores obtidos no capítulo anterior para os índices de conversão, durante a fase de iniciação não houve diferenças significativas entre tratamentos. Na fase de crescimento houve um decréscimo de performance de todas as dietas com redução do teor proteico e de aminoácidos. Já na fase de acabamento e no geral, a enzima protease melhorou em parte os índices quanto estes eram pobres em proteína bruta e aminoácidos. Em animais mais jovens (12 a 25 dias de idade), a protease não teve uma acção tão evidente como na fase posterior. Muitos foram os autores (Zanella et al., 1999; Toledo et al., 2007; Yu et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Kaczmarek et al., 2014), que não houve diferenças significativas entre dietas controle e dietas de baixa densidade suplementadas com protease ou misturas enzimáticas.

Angel et al. (2011) demonstraram que uma dieta de milho e bagaço de soja com um teor proteico reduzido suplementada em 200 mg/kg protease, apresenta IC semelhantes à dieta controlo não suplementada. Também Cowieson et al. (2008) verificaram que a suplementação de xilanase, amilase e protease melhorou a eficiência alimentar em comparação com as dietas não suplementadas. A dieta de baixa densidade suplementada teve melhor eficiência alimentar que a dieta controlo não suplementada.

Resultados díspares de vários autores demonstram a necessidade de mais estudos para compreender melhor a influência da protease no IC dos frangos de carne.

A viscosidade dos conteúdos digestivos é um problema muito relevante para dietas à base de cevada ou centeio e menos para as dietas à base de trigo, sendo mínima no caso do milho. Isto deve-se ao tipo de fibras solúveis e ao tamanho das suas cadeias ser muito menor no caso do milho do que nos outros grãos de cereais. Knudsen (1997) demonstrou que o milho contém baixas concentrações de PNA solúveis (<1 g/kg vs 25 g/kg no trigo), por isso questões como viscosidade, taxa de passagem, capacidade de retenção de água não sejam consideradas relevantes, para o caso do milho. De qualquer modo, o valor nutricional do milho varia consideravelmente, apesar de ter uma baixa concentração de PNA solúveis, considera-se que seja devido à variação da solubilidade/digestibilidade do amido e proteína (Cowieson, 2005). Graham et al. (1989) explica que a solubilização do amido ocorre durante o processo de granulação do alimento, mas que a magnitude do seu impacto é tão mínima, que é bem provável o efeito ser de pouca importância.

Relativamente aos valores obtidos para a viscosidade, não houve diferenças significativas entre tratamentos para os conteúdos do duodeno+jejuno e do íleo no final do ensaio. A razão pela qual não houve diferenças significativas deve-se ao facto de a protease não atuar sobre os PNA, apenas atua sobre a proteína. Estes resultados estão igualmente de acordo com os estudos realizado por Zanella et al. (1999) e Gracia et al. (2003). Gracia et al. (2003) suplementou uma dieta de milho e bagaço de soja com  $\alpha$ -amilase não obtendo diferenças significativas entre tratamentos. Também Zanella et al. (1999), numa dieta de milho e soja, onde os tratamentos apresentam diferentes fontes de soja (tostada, extrudida e bagaço), suplementada com xilanase, amilase e protease também não obtiveram diferenças significativas entre tratamentos.

O tamanho e o peso relativo dos órgãos do tubo digestivo reflete-se no rendimento da carcaça, e por conseguinte, quanto menor forem os valores, melhor será o rendimento da carcaça, um parâmetro de elevado interesse económico para os avicultores. Segundo Wang et al. (2005), o aumento do peso e do comprimento dos órgãos deve-se ao aumento da viscosidade, que inibe o contacto entre as enzimas digestivas e os seus substratos, levando



a modificações estruturais e funcionais do intestino. Brenes et al. (1993) indicam que este aumento das dimensões dos órgãos do sistema digestivo pode ser uma resposta adaptativa a uma necessidade crescente de enzimas.

Para o estudo, não se observaram diferenças significativas entre o peso e o comprimento relativo dos órgãos dos frangos de carne nos diferentes tratamentos. A ausência de diferenças significativas para as dimensões dos órgãos talvez se deva à baixa quantidade de PNA solúveis no milho e no bagaço de soja, não sendo expectável uma alteração nas dimensões dos órgãos do sistema digestivo.

Estes resultados estão igualmente de acordo com os estudos realizado por Zanella et al. (1999) e Nunes et al. (2015), mostraram que não houve diferenças significativas entre tratamentos para as dimensões dos órgãos. No caso de Gracia et al. (2003), não houve diferenças significativas para o peso relativo do proventrículo, moela, fígado e intestino delgado entre os diferentes tratamentos, apenas houve diferenças significativas para o peso relativo do pâncreas, onde a suplementação de  $\alpha$ -amilase diminuiu o peso relativo do órgão. Esta redução do peso relativo do pâncreas deve-se à menor secreção de amilase endógena devido à presença de amilase exógena no intestino.

## Capítulo VI- Conclusão

Os regimes alimentares fornecidos no presente estudo eram constituídos por milho e bagaço de soja, tendo sido preparados quatro diferentes tratamentos, uma dieta controlo, dois tratamentos reduzidos em 5% do teor de proteína bruta e de aminoácidos (um suplementado com protease) e um tratamento igual à dieta controlo suplementado com protease, onde se retirou a contribuição proteica e de aminoácidos da protease.

Para as dietas de baixa densidade proteica e de aminoácidos, a suplementação de protease melhorou o peso vivo e ganho médio de peso, de modo a compensar a falta de nutrientes. O tratamento onde foi retirado a contribuição da proteína bruta e aminoácidos por parte da protease teve um índice de conversão igual à dieta controlo na fase de acabamento, compensando a perda de performance na fase de crescimento. Esta compensação permitiu, no geral, que ambos os tratamentos tivessem uma performance semelhante. Não houve diferenças significativas entre tratamentos para a ingestão de alimento, viscosidade dos conteúdos digestivos e dimensões dos órgãos do sistema digestivo. Estes resultados permitem concluir que a suplementação da enzima protease melhorou os índices produtivos, especialmente quando as dietas eram mais pobres em proteína bruta e aminoácidos. Também se pode dizer, que a suplementação da protease permite baixar os níveis de proteína bruta e de aminoácidos numa dieta sem alterar os índices produtivos dos frangos de carne, permitindo diminuir a excreção de azoto e riscos ambientais.

Este trabalho contribuiu para reforçar o efeito positivo da suplementação de protease nos índices produtivos dos frangos de carne em dietas de milho e bagaço de soja. Ainda assim, mais trabalhos devem ser realizados com a protease, como único suplemento enzimático, de modo, a estabelecer o seu verdadeiro potencial no sector avícola.

## Capítulo VII- Referências Bibliográficas

- Acosta, A., M. Cárdenas (2006) Enzimas en la alimentación de las aves. Fitassas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 4, 377-387.
- Angel, C.R., W. Saylor, S.L. Vieira, N.Ward (2011) Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poultry Science* 90, 2281-2286.
- Appleby, M.C., B. O. Hughes, H. A. Elson (1992) *Poultry Production Systems: Behaviour, Management and Welfare*. UK
- Aviagen (2014) ROSS Broiler Management Handbook.
- Bedford, M.R. (1995) Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes: *Animal Feed Science and Technology* 53, 145-155.
- Bedford, M.R., H. Schulze (1998) Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews* 11, 91-114.
- Bedford, M.R. (2000) Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology* 86, 1-13.
- Bell, D.D., W.D. Weaver (2002) *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. Kluwer Academic Publishers
- Beski, S.S.M., R.A. Swick, P.A. Iji., 2015. Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. *Animal Nutrition* 1, 47-53.
- Brenes, A.M.S., M. Smith, W. Guenter, R.R. Marquardt (1993) Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat- and barley-based diets. *Poultry Science* 72, 1731-1739.
- Cabral, M.G., A. Viegas, M.C. Teixeira, I. Sá-Correia (2003) Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere* Volume 51, Issue 1, 47-54.
- Café, M.B., C.A. Borges, C.A. Fritts, P.W. Waldroup (2002) Avizyme improves performance of broilers fed corn-soybean meal based diets. *The Journal of Applied Poultry Research* 11, 29-33.
- Choct, M. (1997) Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. *Feed Milling International*, June Issue, 13-26.
- Choct, M. (1998) The effect of different xylanases on carbohydrate digestion and viscosity along the intestinal tract in broilers. *Australian Poultry Science Symposium* 10, 111-115.
- Choct, M. (2006) Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 62, 5-16.
- Cooper G.M., (2000) The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. *The Cell: A Molecular Approach*. (2<sup>nd</sup> ed.).

- Cowieson A.J., V. Ravindran (2008) Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science* 49:37-44.
- De Blas, C., G.G. Mateos, P. García-Rebollar (2010). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición)*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Disponible em: [http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/harina-de-soja-47-pb](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-soja-47-pb)
- De Blas, C., G.G. Mateos, P. García-Rebollar (2016) *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición)*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Disponible em: <http://www.fundacionfedna.org/node/370>
- Englert, S. (1982) *Avicultura* (4ª ed.) Leal.
- Fersht, A. (1987) *Enzyme Structure and Mechanism* (2<sup>nd</sup> ed.).
- Figueiredo, A.A., B.A. Correia, T. Ribeiro, P.I.P. Ponte, L. Falcão, J.P. Freire, J.A.M. Prates, L.M.A. Ferreira, C.M.G.A. Fontes, M.M. Lordelo (2012) The effects of restricting enzyme supplementation in wheat-based diets to broilers. *Animal Feed Science and Technology* 172, 194-200.
- Ghazi, S., J.A. Rooke, H. Galbraith, M.R. Bedford (2002) The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *British Poultry Science* 43, 70-77.
- Gracia, M.I., M.J. Aranibar, R. Lázaro, P. Medel, G.G. Mateos (2003)  $\alpha$ -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science* 82, 436-442.
- Graham, H., J.G. Fadel, C.W. Newman, C.W., R.K. Newman (1989) Effect of pelleting and  $\beta$ -glucanase supplementation on the ileal and faecal digestibility of a barley-based diet in the pig. *Journal of Animal Science* 67, 1293-1298.
- Greiner, R., U. Konietzny (2010) Phytases: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In M.R.Bedford & G.G. Partridge. *Enzymes In Farm Animal Nutrition* (2<sup>nd</sup> ed.), 96-128.
- Isaksen, M.F., A.J. Cowieson, K.M. Kragh (2010) Starch- and Protein-degrading Enzymes: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In M.R.Bedford & G.G. Partridge. *Enzymes In Farm Animal Nutrition* (2<sup>nd</sup> ed.), 85-95.
- Jacob, J. (2015) Antinutritional Factors in Feed Ingredients. *Extension*. Disponible em: (<https://articles.extension.org/pages/66921/antinutritional-factors-in-feed-ingredients>).
- Kaczmarek, S.A., A. Rogiewicz, M. Mogielnicka, A. Rutkowski, R. O. Jones, B. A. Slominski (2014) The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry Science* 93, 1745-1753.
- Khattak, F.M., T.N. Pasha, Z. Hayat, A. Mahmud (2006) Enzymes In Poultry Nutrition. *Journal of Animal and Poultry Science* 16, 1-7.

- Knudsen, K.E.B. (1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology* 67 (4), 319-338.
- Larbier, M., B. Leclercq, (1992) *Nutrition et alimentation des volailles*. INRA
- Lázaro, R., G.G. Mateos (2008) Necesidades nutricionales para avicultura: pollos de carne y aves de puesta, *FEDNA*, 3-25.
- Leeson, S., J.D. Summers (2001) *Scott's Nutrition of the Chicken* (4<sup>th</sup> ed.). Canada: University Books.
- Lima, C.B., F.G.P. Costa, J.V.Ludke, D.M.L. Júnior, T.M.A. Mariz, A.A. Pereira, G.M. Silva, A.C.A. Almeida (2014) Antinutritional factors and processing of soybean feed. *Agropecuária Científica no Semiárido* 10, 24-33.
- Lisboa, M.M., R.V.F. Filho, M.M.S. Pereira, J.W.D. Silva (2014) Artigo 278- Uso de Colina na Avicultura. *Nutritime* 11 (6), 3755-3759. Disponível em: [http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/ARTIGO278.pdf](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/ARTIGO278.pdf)
- Maiorka, A., E. Santin, A.V.F. Silva, L.D.G. Bruno, I.C. Boleli, M. Macari (2000) Desenvolvimento do trato gastrointestinal de embriões oriundos de matrizes pesadas de 30 e 60 semanas de idade. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, 141-148.
- Maiorka, A., F. Dahlke, M.S.F.A Morgulis (2006) Broiler adaptation to post-hatching period. *Ciencia Rural* 36(2), 701-708.
- Marquardt, R.R., A. Brenes, Z. Zhang, D. Boros (1996) Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science Technology* 60, 321-330.
- Marsman, G.J.P., H. Gruppen, A.F.B. Van der Poel, R.P. Kwakkel, M.W.A. Verstegen, A.G.J. Voragen (1997) The effect of thermal processing and enzyme treatments of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chime characteristics in broiler chicks. *Poultry Science* 76, 864-872.
- Mavromichalis, I. (2012) Mixed or single enzymes for non-starch carbohydrates? *All About Feed*, 25-26.
- McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan, L.A. Sinclair, R.G. Wilkinson (2010). *Animal Nutrition* (7th Edition)
- Mendes, A.R., T. Ribeiro, B.A. Correia, P. Bule, B. Maças, L. Falcão, J.P.B. Freire, L.M.A. Ferreira, C.M.G.A. Fontes, M.M. Lordelo (2013). Low doses of exogenous xylanase improve the nutritive value of triticale-based diets for broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 22, 92-99.
- Noy, Y., D. Sklan (1997) Posthatch development in poultry. *The Journal of Applied Poultry Research* 6, 344-354.
- Noy, Y., D. Sklan (1999) Energy Utilization in Newly Hatched Chicks. *Poultry Science* 78, 1750-1756.
- Noy, Y., D. Sklan (2001) Yolk and Exogenous Feed Utilization in the Posthatch Chick. *Poultry Science* 80, 1490-1495.
- Noy, Y., D. Sklan (2002) Nutrient Use in Chicks During the First Week Posthatch. *Poultry Science*

- Nunes, J.O., R.D. Abreu, J.A.G. Brito, R.F. da Silva, L.S. Oliveira, N.A. Jesus (2015) Enzyme Supplementation of Broiler Feeds with Reduced Mineral and Energy Levels. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* vol.17, 15-22.
- Oxenboll, K.M., K. Pontoppidan, F. Fru-Nji (2011) Use of a Protease in Poultry Feed Offers Promising Environmental Benefits. *International Journal of Poultry Science* 10 (11): 842-848.
- Paloheimo, M., J. Piironen, J. Vehmaanpera (2010) Xylanases and Cellulases as Feed Additives. in Enzymes. In M.R.Bedford & G.G. Partridge (Eds.), *Farm Nutrition* (2nd ed.). CABI.
- Parkhurst, C.R., Mountney, G.J. (1988) *Poultry Meat and Egg Production*. Avi Book.
- Ravindran, V. (2010) Aditivos en la Alimentación Animal: Presente y Futuro. XXVI Curso Especialización FEDNA
- Ravindran, V. (2013) Feed enzymes: The science, practice and metabolic realities. *The Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 628-636.
- Runho, R.C., P.C. Gomes, H.S. Rostagno, L.F.T. Albino, P.S. Lopes, P.C. Pozza (2001) Exigência de Fósforo Disponível para Frangos de Corte Machos e Fêmeas de 1 a 21 Dias de Idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(1), 187-196.
- Santos, C.I., T. Ribeiro, P.I.P. Ponte, V.O. Fernandes, L. Falcão, J.P. Freire, J.A.M. Prates, L.M.A. Ferreira, C.M.G.A. Fontes, M.M. Lordelo (2013) The effects of restricting enzyme supplementation in rye-based diets for broilers. *Animal Feed Science and Technology* 186, 214-217.
- Scragg, A.H. (1988) *Biotechnology for Engineers, Biological Systems in Technological Processes*. Ellis Horwood Limited.
- Simbaya, J., B.A. Slominski, W. Guenter, A. Morgan, L.D. Campbell (1996) The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: in vitro and in vivo studies. *Animal Feed Science and Technology* 61, 219-234.
- Sklan, D., Y. Noy (2000) Hydrolysis and Absorption in the Small Intestines of Posthatch Chicks. *Poultry Science* 79, 1306-1310.
- Sklan, D., (2003) Fat and Carbohydrate Use in Posthatch Chicks. *Poultry Science* 82, 117-122.
- Slominski, B.A. (2011) Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science* 90, 2013-2023.
- Smith, J.E. (2009) *Biotechnology* (5<sup>th</sup> Edition). Cambridge University Press
- Svihus, B., M. Choct, H.L. Classen (2013) Functional and nutritional roles of the avian caeca. *World's Poultry Science Journal* 69, 249-263.
- Svihus, B. (2014) Function of the digestive system. *The Journal of Applied Poultry Research* 23, 306-314.
- Thacker, P. (2005) Fed wheat or corn based diets supplemented with xylanase or protease alone or in combination. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 4, 276-281.

- Toledo, G.S.P., P.T.C. Costa, J.H. Silva, M.L. Ceccantini, C. Poletto (2007) Broilers fed diets varying in energy and protein supplemented with a pool of enzymes. *Ciência Rural* 37, 518-523.
- Troche, C., X. Sun, A.P. McElroy, J. Remus, C.L. Novak (2007) Supplementation of Avizyme 1502 to Corn-Soybean Meal-Wheat Diets Fed to Turkey Tom Poults: The First Fifty-Six Days of Age. *Poultry Science* 86, 496-502.
- Uni, Z., Y. Noy, D. Sklan (1995) Posthatch Changes in Morphology and Function of the Small Intestines in Heavy- and Light-Strain Chicks. *Poultry Science* 74, 1622-1629.
- Uni, Z., S. Ganot, D. Sklan (1998) Metabolism and Nutrition: Posthatch Development of Mucosal Function in the Broiler Small Intestine. *Poultry Science* 77, 75-82.
- Uni, Z., E. Tako, O. Gal-Garber, D. Sklan (2003) Morphological, Molecular, and Functional Changes in the Chicken Small Intestine of the Late-Term Embryo. *Poultry Science* 82, 1747-1754.
- Wang, Z.R., S.Y. Qiao, W.Q. Lu, D.F. Li (2005) Effects of Enzyme supplementation on performance, nutrient, digestibility, gastrointestinal morphology and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poultry Science* 84, 875-881.
- Willis, S. (2003) The Use of Soybean Meal and Full Fat Soybean Meal by the Animal Feed Industry. 12<sup>th</sup> Australian Soybean Conference. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/267242105\\_The\\_use\\_of\\_Soybean\\_Meal\\_and\\_Full\\_Fat\\_Soybean\\_Meal\\_by\\_the\\_Animal\\_Feed\\_Industry](https://www.researchgate.net/publication/267242105_The_use_of_Soybean_Meal_and_Full_Fat_Soybean_Meal_by_the_Animal_Feed_Industry)
- Wu, Y.B., V. Ravindran (2004) Influence of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, digestive tract measurements and carcass characteristics of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 116, 129-139.
- Yang, Z., W. Yang, S. Jiang (2010) Effects of a thermotolerant multi-enzyme product on nutrient and energy utilization of broilers fed mash or crumbled corn-soybean meal diets. *The Journal of Applied Poultry Research* 19(1), 38-45.
- Yin, D., X. Yin, X. Wang, Z. Lei, M. Wang, Y. Guo, S.E. Aggrey, W. Nie, J. Yuan (2018) Supplementation of amylase combined with glucoamylase or protease changes intestinal microbiota diversity and benefits for broilers fed a diet of newly harvested corn. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.
- Yu, B., S.T. Wu, C.C. Liu, R. Gauthier, P.W.S. Chiou (2007) Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. *Animal Feed Science and Technology* 134, 283-294.
- Zanella, I., N.K. Sakomura, F.G. Silversides, A. Figueiredo, M. Pack (1999) Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science* 78, 581-568.